

PCT/KR 03/02654

RO/KR 04.12.2003

REC'D 23 DEC 2003

WIPO

PCT

Rec'd

PCT/PTO

06 JUN 2005



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0085837
Application Number

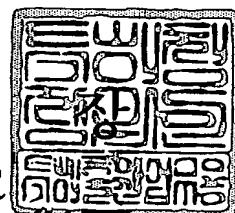
출원년월일 : 2003년 11월 28일
Date of Application
NOV 28, 2003

출원인 : 주식회사한국신약 외 1명
Applicant(s) HANKOOK PHARM. CO., INC., et al.

2003 년 12 월 04 일



특허청
COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003. 11. 28
【발명의 명칭】	항산화 및 노화 억제 활성을 가지는 박태기나무 추출물 및 이를 함유하는 항산화, 피부 노화 억제 및 주름 개선용 화장료 조성물
【발명의 영문명칭】	Extract of Cercis chinensis having anti-oxidant activity and anti-aging activity, and cosmetical composition containing the extract for anti-oxidation, skin-aging protection and wrinkle improvement
【출원인】	
【명칭】	주식회사 한국신약
【출원인코드】	2-1999-900022-1
【출원인】	
【명칭】	주식회사 한생화장품
【출원인코드】	1-1998-004424-9
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-028542-6
【포괄위임등록번호】	1999-040871-4
【발명자】	
【성명의 국문표기】	나민균
【성명의 영문표기】	NA,Min Kyun
【주민등록번호】	741010-1454632
【우편번호】	302-812
【주소】	대전광역시 서구 관저동 999 원양마을아파트 412동 602호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유재국
【성명의 영문표기】	YOO,Jae-Kuk
【주민등록번호】	610520-1405411

【우편번호】 302-771
【주소】 대전광역시 서구 둔산1동 목련아파트 105동 1301호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이찬복
【성명의 영문표기】 LEE, Chan Bog
【주민등록번호】 660510-1452913
【우편번호】 302-210
【주소】 대전광역시 서구 복수동 계룡아파트 3동 903호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김진표
【성명의 영문표기】 KIM, Jin Pyo
【주민등록번호】 701009-1408549
【우편번호】 302-723
【주소】 대전광역시 서구 관저동 구봉마을아파트 801호 1306호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 임곤혁
【성명의 영문표기】 LIM, GON HYEOK
【주민등록번호】 380505-2408912
【우편번호】 302-761
【주소】 대전광역시 서구 내동 220-2번지 롯데아파트 109동 1302호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 민동일
【성명의 영문표기】 MIN, DONG IL
【주민등록번호】 431114-1405915
【우편번호】 302-842
【주소】 대전광역시 서구 삼천동 991번지 국화아파트 105동 1003호
【국적】 KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

전영민

【성명의 영문표기】

JEON, YOUNG MIN

【주민등록번호】

670709-1408912

【우편번호】

302-755

【주소】

대전광역시 서구 갈마동 407번지 갈마아파트 203동 102호

【국적】

KR

【우선권주장】**【출원국명】**

KR

【출원종류】

특허

【출원번호】

10-2002-0085382

【출원일자】

2002.12.27

【증명서류】

첨부

【심사청구】**【취지】**

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】**【기본출원료】**

20 면 29,000 원

【가산출원료】

62 면 62,000 원

【우선권주장료】

1 건 26,000 원

【심사청구료】

13 항 525,000 원

【합계】

642,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 항산화, 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지 또는 주름 억제용 박태기나무(*Cercis chinensis*) 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 피부 노화 억제 및 주름 개선용 화장료 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 자원확보가 용이하고 기존에 항산화 활성 및 피부세포 노화 억제활성에 관한 보고가 없었던 박태기나무의 알코올 조추출물을 용매 분획한 후, 항산화 활성을 보이는 에틸아세테이트 분획과 부탄을 분획으로부터 분리한 항산화 활성, 노화 억제 활성을 갖는 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물을 포함하는 박태기나무 추출물 및 이를 포함하는 피부 노화 억제용 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 박태기나무 추출물은 피부의 노화를 유발하는 산화적 스트레스를 억제하는 기능이 우수할 뿐 만 아니라 노화와 관련된 텔로미어 길이의 단축 속도를 늦춤으로써 피부세포의 수명을 연장시킬 수 있으므로, 박태기나무 추출물을 포함하는 화장료 조성물은 피부 노화 방지, 피부 탄력 유지 또는 주름 완화를 위한 피부의용제형의 화장료로서 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 9

【명세서】**【발명의 명칭】**

항산화 및 노화 억제 활성을 가지는 박태기나무 추출물 및 이를 함유하는 항산화, 피부 노화 억제 및 주름 개선용 화장료 조성물{Extract of Cercis chinensis having anti-oxidant activity and anti-aging activity, and cosmetical composition containing the extract for anti-oxidation, skin-aging protection and wrinkle improvement}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 박태기나무로부터 에탄올 조추출물을 얻고, 이를 헥산, 에틸아세테이트, 부탄을 순으로 추출하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 박태기나무로부터 에탄올을 0%부터 순차적으로 10%씩 늘여 100% 농도까지 추출한 에탄올 조추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 그래프이다.

도 3은 헥산, 에틸아세테이트, 부탄을, 물 분획 및 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 그래프이다.

도 4는 에틸아세테이트 분획으로부터 항산화 활성을 나타내는 화합물을 분리하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 5는 부탄을 분획으로부터 항산화 활성을 나타내는 화합물을 분리하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 6a는 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 화합물의 UV 조사에 대한 세포 보호 효과를 나타낸 DNA 손상 정도를 보여주는 세포 사진이다.

도 6b는 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 화합물의 UV 조사에 대한 세포 보호 효과를 나타낸 DNA 손상 정도를 보여주는 형광 세기를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 화합물이 UV 조사에 대해 보호 효과를 나타내는지 확인한 무모쥐의 피부손상 사진이다.

도 8은 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 화합물이 세포수명을 연장시키는 것을 나타낸 그래프이다.

도 9은 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 화합물이 텔로미어 길이의 단축속도를 억제하는 텔로미어 길이의 서던블롯 사진이다.

도 10은 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 화합물이 텔로미어 길이 연장 작용을 하는 것을 나타낸 텔로미어 단축 속도 그래프이다.

도 11은 박태기나무의 꽃, 잎, 줄기 및 열매를 나타낸 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

:13> 본 발명은 피부노화 억제 활성을 갖는 식물 추출물 및 이를 유효성분으로 포함하는 노화 억제용 화장료 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 산화적 스트레스에 대한 억제활성 및 피부세포 수명 연장 효과가 우수한 박태기나무 추출물을 포함하는 피부 노화 억제용 화장료 조성물을 관한 것이다.

14) 노화란 시간이 지남에 따라 일어나는 신체의 모든 생리적 변화를 통칭하는 것으로 개체에 따라 수많은 요인에 의해 매우 다양하게 일어나는 생명 현상이다. 노화는 개체마다 그 양상과 속도가 다르고, 한 개체 내에서도 각 조직마다 그 양상이 다르므로 노화를 개체 수준에서 연구하는 것은 많은 어려움이 있다. 한편, 노화 현상을 구체적으로 살펴보면 각 구성 기관 및 조직의 기능 변화가 일어나는 것으로, 이는 구성단위인 세포들의 기능 변화에 기인한다. 즉, 뇌의 신경세포 소실로 인해 인지기능이 저하된다든지, 피하 지방 세포의 소실로 피부의 탄력이 감소한다든지, 모근 멜라닌 세포가 멜라닌 색소 생성 능력을 소실함으로써 머리가 희어지는 등, 개체의 노화는 결국 그 개체를 구성하는 세포들의 노화에 기인한다. 그러므로 최근에는 노화의 연구도 세포수준에서 많이 이루어지고 있다. 지난 수십년 동안 수많은 과학자들이 세포의 노화에 관하여 연구해 왔지만, 노화의 다양한 현상과 복합적인 특징으로 인해 아직 정확한 기전은 규명되지 못하고 있다. 다만, 수많은 현상학적 연구를 통해 노화에 관한 여러 가지 가설이 제기되었는데, 이 중 정상적인 대사과정에서 발생하는 활성산소에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)가 축적되어 노화의 원인이 된다는 노화의 활성산소설과 염색체 말단부분에 있는 텔로미어(telomere)가 세포분열을 거듭함에 따라 점차 소실되어 세포분열이 정지되고 결국 사멸에 이른다는 노화의 텔로미어설이 중요하게 받아들여지고 있다. 이외에도 여러 가지 가설이 있지만 이러한 가설은 서로 상반된 것이 아니라 서로 보완적으로 노화를 설명하고 있다.

노화의 활성산소설이란, 정상적인 대사과정에서 부수적으로 생성되는 활성산소들은 반응성이 강해 세포 구성성분인 지질, 단백질, 당, 또는 DNA 등을 비선택적, 비가역적으로 파괴하여 세포나 조직의 산화적 스트레스를 유발시킴으로써, 암을 비롯하여 뇌졸중 및 죽상 동맥경화와 같은 심혈관계 질환, 류마티스 같은 만성염증 질환, 호흡기 질환 또는 자가면역질환 등 각종 질병을 유발할 뿐만 아니라(Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C, *Biochem. J.*, 1984, 219,

1-14; Freeman, B. A. and Grapo, J. D., *Lab Invest*, 1982, 47, 412-426; Ames, B. N., , 1983, 221, 1256-1264; Fridovich, I., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 247, 1-11; Vishwanath, M. S., *Nutrition in Clinical Practice*, 1995, 10, 19-25), 이러한 산화적 손상들이 오랜 시간 축적되어 노화와 죽음에 이르게 된다는 것이다. 이러한 노화의 활성 산소설은 1956년 하르만(Harman)에 의하여 처음 제안되었고(Harman, D., *Free radical theory of aging*, Alan R Liss, New York, 1986, 3-49), 이후 여러 실험결과들이 상기 가설을 뒷받침 해주고 있다. 실험조건을 달리해 식이를 제한하거나 운동량을 감소시키는 등 기초대사율, 즉, 산소소비량을 감소시킴으로서 수명이 연장되는 것이 관찰되었다(Medvedev, Z. A., *Biol. Rev.*, 1990, 65, 375-398; Loe, J., Northrop, J.H., *J. Biol. Chem.*, 1971, 32, 103-121; Sohal, R. S., , Springer-Verlag, Heidelberg, 1986, 23-44; Sohal, R. S., *Aging*, 1982, 5, 21-24).

15> 한편, 생체내에는 산화적 손상으로부터 방어하기 위한 항산화 물질들과 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, 이하 'SOD'라 약칭함), 카탈라제(catalase) 또는 퍼옥시다제(peroxidase)와 같은 항산화 효소들이 존재하는데, 나이가 들어 늙어감에 따라 활성 산소에 대한 방어 능력이 감소한다는 사실이 보고되었다(Orr, W. C. and Sohal, R. S., *Science*, 1994, 263, 1128-1130; Sohal, R. S. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 15671-15674). 즉, 늙은 쥐의 간에서 분리된 SOD는 어린 쥐의 SOD 보다 활성이 낮았으며, 특히 초파리에 항산화 효소인 SOD와 카탈라제의 활성을 높여주면 수명이 30% 이상 증가하여 활성산소와 노화가 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 따라서, 활성 산소를 소거할 수 있는 물질이나 지질 과산화 억제 물질과 같은 항산화제는 활성산소에 의해 유발되는 각종 질환 치료제 및 노화예방을 위한 억제제로서 기대를 도하고 있다.

<16> 또한, 대기오염, 자외선 노출, 스트레스 또는 질병 등의 유해환경으로부터 산화적 스트레스(oxidative stress)에 계속적으로 노출되면, 체내에 라디칼이 증가되고 진피의 결합조직인 콜라겐(Collagen), 엘라스틴(Elastin), 히아루론산(Hyaluronic acid) 등을 파괴하여 피부의 일정 부위 침하 현상(주름)을 일으킬 수 있으며, 또한 세포막의 지질 부분을 산화시켜 세포의 파괴 현상을 일으켜 피부염, 여드름 또는 피부암 등의 질병을 유발할 수 있다. 이외에도 라디칼은 멜라닌 형성과정에 관여하여 기미, 주근깨 및 주름생성의 원인이 되기도 한다. 기존에는 아스코르브산, α -토코페롤 또는 SOD 등이 자유 라디칼 소거 기능 물질로 화장료나 의약품에 배합되어 주름 및 기타 피부 질환을 방지하기 위하여 이용되어 왔으나, 이들은 가격이 고가일 뿐만 아니라 배합시 화학적 안정성이 좋지 못하여 실질적인 효과를 기대하기가 어려운 문제점이 있었다. 이러한 이유로 보다 안전하면서 자유라디칼 소거 효과가 높은 물질을 개발하는 것이 의약품이나 식품 분야 뿐 만 아니라 화장품 산업 분야에서도 중요한 과제로 대두되어 많은 연구가 진행되고 있다.

<17> 노화현상을 이해하기 위한 또 하나의 이론으로 노화의 텔로미어 가설이 있다. 사람의 정상세포는 생체외(in vitro)에서 정해진 횟수만큼만 세포분열을 하고 더 이상 분열하지 않는다. 이것을 복제노화라 하는데, 이러한 현상이 왜 일어나는지를 설명해주는 것이 바로 텔로미어 가설이다(Kim, S.H., et al., *Oncogene* 21: 503-511 (2002); Harley, C.B., et al., *Nature* 345: 458-460 (1990); Olovnikov, A.M. *J. Theoret. Biol.* 41: 181-190 (1973); Harley, C.B., *Exp. Gerontol.* 27: 375-382 (1992); Allsopp, R.C., Weissman, I.L., *Oncogene*, 21: 3270-3273 (2002)). 텔로미어는 진핵세포 선형 염색체의 말단 부분으로 TTAGGG 염기서열이 반복되는 특이한 구조로 이루어져 있는데, 특히 구아닌(G)은 수소결합을 통해 매우 안정한 G-사분체

(quartet) 구조를 형성함으로써 염색체를 안정화 시켜 염색체를 보호하는데 중요한 역할을 한다(Moyzis, R.K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6622-6626 (1988)). 하지만, 사람의 체세포는 세포분열을 할 때마다 텔로미어 길이가 점점 감소되는 것으로 밝혀졌다(Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W., *Nature* 345: 458-460 (1990); Harley, C.B. et al., 27: 375-382 (1992); Allsopp, R.C., Weissman, I.L., *Oncogene* 21: 3270-3273 (2002)). 이러한 현상은 DNA가 복제될 때 3'-말단의 프라이머 부분이 복제되지 못하는 소위 "말단 복제 문제(End replication problem)" 때문에 일어난다(Olovnikov, A.M. 41: 181-190 (1973)). 그러므로, 세포는 한번 분열할 때마다 프라이머 부분만큼 짧은 DNA가 복제되며, 분열을 거듭함에 따라 염색체의 텔로미어 길이가 짧아져 임계 길이 이하가 되면 DNA의 단일가닥과 이중가닥이 끊어지게 되고 결국, 사이클린 의존 키나제(cyclin dependent kinase)의 억제제들을 유도시켜 세포분열이 G1기에 정체된다(Harley, C.B., et al., *Exp. Gerontol.*, 27: 375-382 (1992)). 최근 연구에 의하면 텔로미어 길이는 산화적 스트레스의 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 즉, 산화적 스트레스는 텔로미어 단축 속도를 증가시키는데, 이것은 산화적 손상이 염색체의 다른 부분에 비해 텔로미어 DNA 부분이 덜 복구되기 때문으로 생각되어지고 있다 (Saretzki, G., von Zglinicki, T., 959: 24-29 (2002); von Zglinicki, T., *Ann. New York Acad. Sci.* 908: 99-110 (2000); von Zglinicki, T., *TRENDS Biochem. Sci.* 27: 339-344 (2002); Lorenz, M., et al., 31: 824-831 (2001)).

<18> 이와 같은 노화의 이론에 근거하여 식물로부터 피부노화를 억제 시킬 수 있는 물질을 찾고자 하였다. 식물은 광합성 과정에서 부산물로서 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical)을 비롯한 여러 활성산소들이 생성되기 때문에 이러한 산화적 스트레스로부터 스스로를 보호할 수 있

는 방어체계가 잘 발달되어 있을 것으로 예견된다. 그러므로, 식물은 그 자체가 항산화 물질을 함유하고 있는 중요한 자원이 될 수 있다. 이에, 350여 종의 식물을 대상으로 라디칼 소거 활성 및 지질파산화 억제활성을 조사하여 항산화 활성이 있는 몇 가지 후보식물을 선정하였다. 문헌 고찰 및 자원 확보의 용이성 등을 고려하여 비교적 성분 및 활성에 관한 보고가 없었고 자원 확보가 용이한 박태기나무 (*Cercis chinensis*)를 최종 후보식물로 선정하였다.

- <19> 박태기나무(*Cercis chinensis*)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 낙엽관목으로서 중국이 원산이다. 높이는 3 내지 5 m이고 작은 가지에는 털이 없으며, 여러 개의 껍질 눈이 있다. 잎은 호생하며, 단엽이고, 모양은 등근 심장형으로, 지름은 6 내지 11 cm로서 털은 없으며 가장 자리가 빛나다. 잎의 윗면은 짙은 녹색이며, 윤기가 나고, 뒷면은 연두빛이다. 턱잎은 사각형이고, 일찍 진다. 꽃은 길이가 1 내지 2 cm이고, 잎겨드랑이가 여러송이 붙으며, 화관이 없어 꽂자루만 있다. 꽃 받침은 종모양이고, 위쪽 가장자리에 5개의 무딘 톱니가 있다. 화관은 나비모양이고 자홍색이며, 꽃잎은 5개인데 크기가 일정치 않다. 수술은 10개이고 분리되어 있으며, 기부는 꽃받침 속에 붙어 있고, 꽃실은 가늘고 길다. 암술은 1개이며, 씨방은 광택이 있고, 털은 없으며, 자루가 있다. 암술대 윗부분은 구부러져 있고, 암술머리는 짧고 작으며, 놀려 편평하게 된 모양이다. 개화기는 4월경으로 잎보다 먼저 핀다. 열매는 협과로서 편평한 띠모양이고, 끝은 조금 오그라들어 짧은 주동이 모양이다. 꼬투리는 길이 7 내지 12 cm로 8, 9월에 익으며, 종자는 등글고 편평하며 흑색에 가깝다(李永魯, 原色韓國植物圖鑑, 教學社, 서울, 1996, 362-363). 한방에서는 박태기나무의 수피, 근피, 목질부, 열매, 꽃 등을 각각 자형피(紫荊皮), 자형근피(紫荊根皮), 자형목(紫荊木), 자형과(紫荊果), 자형화(紫荊花)라 하며, 풍한습비(風寒濕痺), 통경(通經), 생리통, 후비(喉痺), 임질, 혈액순환 촉진 등에 사용하고 있다(金昌玟 外., 完譯中藥大辭典, 圖書出版 鼎談, 서울, 1997, 3631-3634).

20> 본 발명자들은 박태기나무로부터 분리한 추출물이 합성 항산화제와는 달리 인체에 무해하고, 다른 천연 항산화제에 비하여 산화적 스트레스에 대한 세포보호활성이 우수할 뿐만 아니라 텔로미어 길이의 단축속도를 늦춤으로써 세포수명을 연장 시킬 수 있으므로 노화 방지, 피부 탄력 유지 또는 주름 개선을 위한 화장료 조성물로서 유용하게 이용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

21> 본 발명은 항산화, 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지 또는 주름 억제용 박태기나무 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항산화용, 피부 노화 억제용 또는 주름 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

22> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 물 또는 알코올 수용액을 추출용매로 사용하여 추출한 항산화용, 피부 노화 억제용, 피부 탄력 유지용 또는 주름 억제용 박태기나무 추출물을 제공한다.

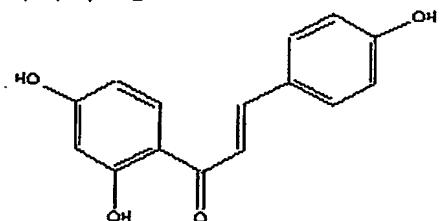
23> 또한, 본 발명은 상기 추출물 또는 이로부터 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 항산화용, 피부 노화 억제용, 피부 탄력 유지용 또는 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

24> 또한, 본 발명은 상기 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공한다.

- <25> 또한, 본 발명은 상기 추출물을 제조하는 방법을 제공한다.
- <26> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <27> 본 발명은 물 또는 알코올 수용액을 추출용매로 사용하여 추출한 항산화용, 피부 노화 억제용, 피부 탄력 유지용 또는 주름 억제용 박태기나무 추출물을 제공한다.
- <28> 본 발명자들은 노화의 활성산소설에 근거하여 140 여 종의 생약과 전국에서 채집한 210 여 종의 식물을 대상으로 항산화 활성을 검색하여 몇 가지 후보 식물을 선정하고, 그 중 자원 확보가 용이하고 항산화 활성에 관한 보고가 없었던 박태기나무의 추출물로부터 항산화 활성을 확인하였다. 본 발명에 사용한 박태기나무는 2001년 9월 중순 대덕 연구 단지 및 충남대학교에서 채집한 것을 식물도감과 비교하여 확증하였으며, 확증 표본은 (주)한국신약 자광연구소에 보관되어 있다.
- <29> 본 발명의 박태기나무 추출물을 제조하는데 사용된 용매는 알코올 수용액으로, 상기 알코올 수용액은 메탄올 수용액, 에탄올 수용액, 프로판올 수용액 및 부탄올 수용액으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 알코올 수용액은 에탄올 수용액인 것이 바람직하며, 에탄올 수용액은 50 내지 80% 에탄올 수용액인 것이 바람직하고, 60% 에탄올 수용액인 것이 더욱 바람직하다.
- <30> 본 발명에 있어서, 박태기나무 추출물은 상기한 박태기나무의 알코올 조추출물, 바람직하게는 에탄올(ethanol, EtOH) 조추출물을 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EtOAc) 및 부탄올(butanol, BuOH)로 추출하여 각각의 분획을 수득한 뒤, 항산화 활성을 나타내는 에틸아세테이트 분획 및 부탄올 분획으로부터 크로마토그래피 과정을 거쳐 제조되며, 에

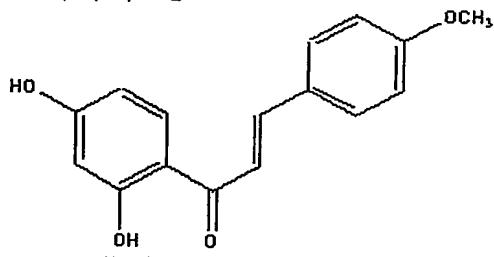
틸아세테이트 분획 및 부탄을 분획으로부터 하기 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물을 포함하는 추출물이 수득된다(도 4 및 도 5 참조). 또한, 구조 분석 결과, 본 발명에서 수득한 화학식 15로 표시되는 화합물(syringetin-3-O-(2"-O-galloyl)-rutinoside)은 현재까지 알려지지 않은 신규한 화합물임을 확인하였다.

<31> 【화학식 1】



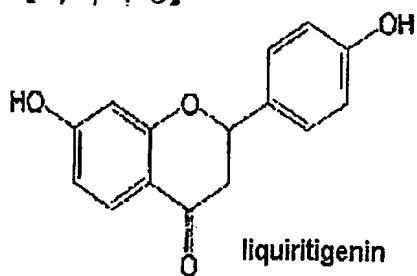
2',4',4-Trihydroxychalcone (Isoliquiritigenin)

<32> 【화학식 2】



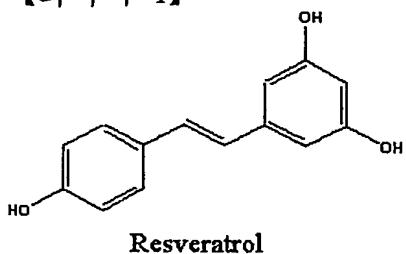
2',4'-Dihydroxy-4-methoxychalcone

<33> 【화학식 3】

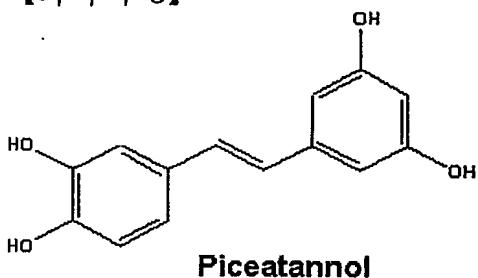


liquiritigenin

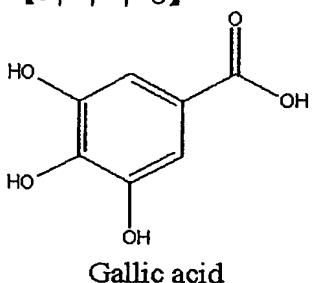
<34> 【화학식 4】



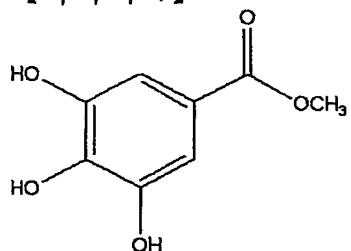
<35> 【화학식 5】



<36> 【화학식 6】

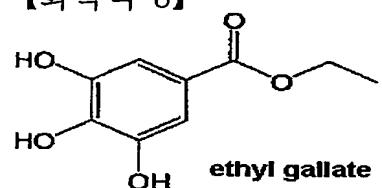


<37> 【화학식 7】



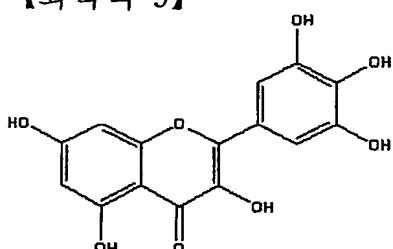
Methyl gallate

<38> 【화학식 8】



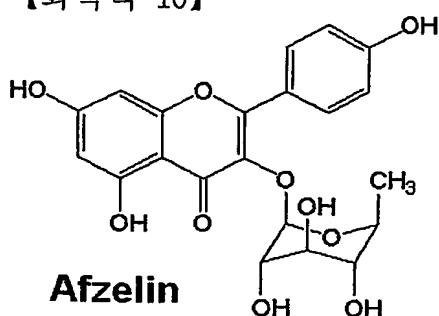
ethyl gallate

<39> 【화학식 9】



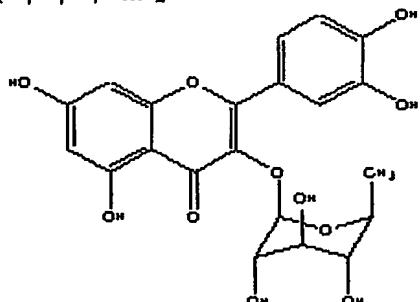
Myricetin

<40> 【화학식 10】

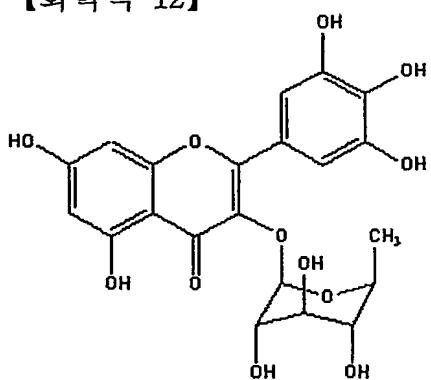


Afzelin

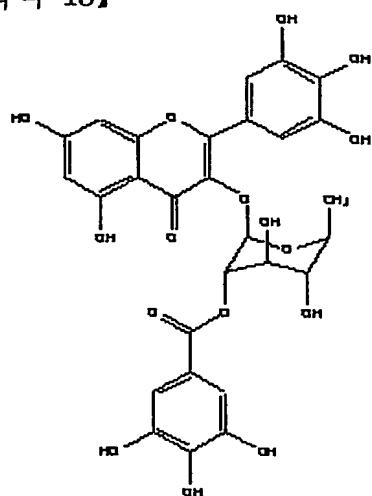
41> 【화학식 11】

Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside (Quercitin)

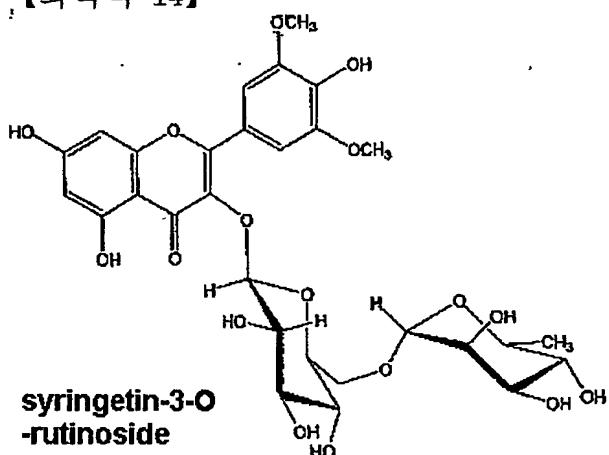
42> 【화학식 12】

Myricetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside

<43> 【화학식 13】

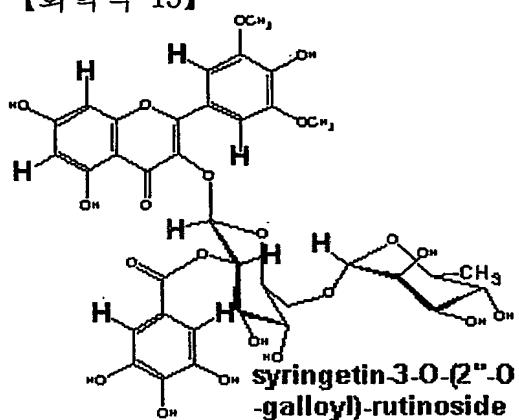
Myricetin-3-O-(2'-O-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside

<44> 【화학식 14】

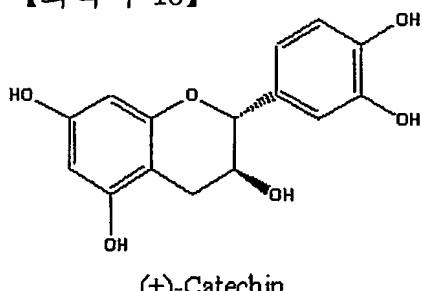


syringetin-3-O-rutinoside

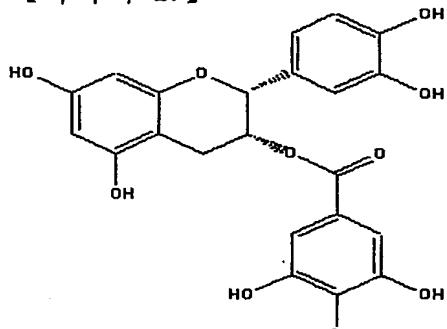
<45> 【화학식 15】



<46> 【화학식 16】

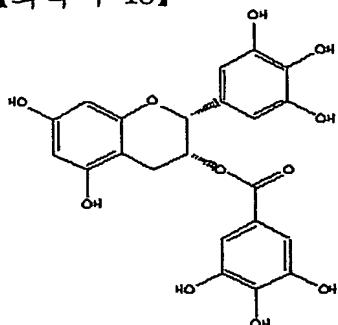


<47> 【화학식 17】



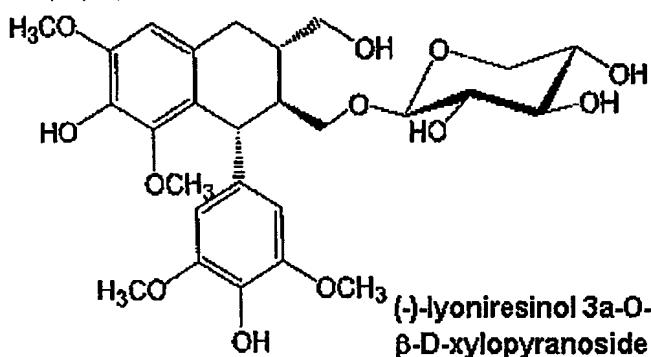
(-)-Epicatechin-3-O-gallate

<48> 【화학식 18】

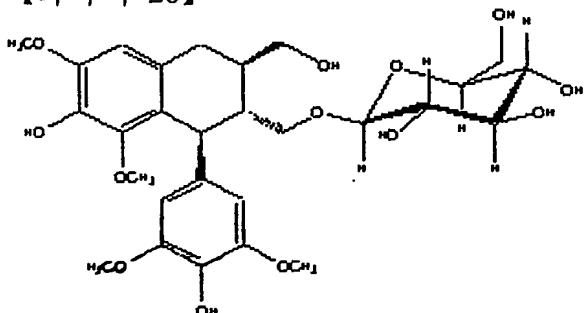


(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate

<49> 【화학식 19】

(-)-Lyoniresinol 3a-O- β -D-xylopyranoside

<50> 【화학식 20】

(+)-Lyoniresinol 3a-O- β -D-glucopyranoside

- 51> 상기 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 본 발명의 화합물의 경우 박태기나무 추출물 총 중량에 대해 화학식 6으로 표시되는 화합물은 0.01 내지 1.00 중량%, 화학식 12로 표시되는 화합물은 0.01 내지 1.00 중량%, 화학식 5로 표시되는 화합물은 0.01 내지 0.5 중량%로 함유하는 것이 바람직하다.
- 52> 상기 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 본 발명의 화합물은 DPPH 라디칼 소거 활성(1,1-Diphenyl-2-Pycryl-Hydrazyl radical scavenging activity)(표 3참조), 지질 과산화 억제활성(Lipid peroxidation inhibitory activity)(표 4 참조), 하이드록실 라디칼 소거 활성(Hydroxyl radical scavenging activity)과 나이트릭 옥사이드 소거 활성(nitric oxide scavenging activity)(표 6 참조) 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성(Superoxide radical scavenging activity)(표 5 참조) 등의 항산화 활성을 가진다.
- <53> 호기성 생물체는 산소를 이용하여 에너지 대사를 진행하고 있으나 생체내 산소가 각종 물리적, 화학적 및 생물학적인 스트레스를 받으면 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical), 과산화수소(H_2O_2) 및 하이드록시 라디칼(hydroxy radical)등의 유해한 활성산소종(active oxygen species)으로 변하여 인체에 치명적인 생리적 장애를 일으킨다. 상기와 같은 활성 산소종은 세포생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화 반응을 일으키고 이로 인해 생체내 축적된 과산화지질은 노화와 각종 질병의 원인이 될 수 있다. 본 발명에서는 상기한 활성산소종의 소거 기능 및 지질 과산화 억제 능력을 조사함으로써, 박태기나무 추출물의 항산화 활성을 측정하였다. 그 결과, 상기 박태기나무 추출물은 기존에 항산화 물질로 알려진 비타민 E 및 합성 항산화제인 BHA(tert-butyl-4-hydroxyanisole)와 활성이 비슷하거나 높게 나타났으며, 상기 결과로부터 박태기나무 추출물은 항산화 활성이 우수한 추출물임을 확인할 수 있다.

<54> 또한, 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 본 발명의 화합물은 t-부틸하이드로페온사이드(t-BuOOH)로 유도되는 산화적 손상에 대한 세포보호 활성(표 7 참조), UV 조사에 대한 세포보호 효과(도 6a 및 도 6b 참조), 무모 생쥐에서의 UV 조사에 대한 보호 효과(도 7 참조), UV 조사에 의한 지질 과산화의 생성 억제 활성(표 8 참조), 세포 수명 연장 효과(도 8 참조), 텔로미어 길이 연장 효과(도 9 및 도 10 참조)를 나타낸다. 즉, 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 활성성분은 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라 세포 노화 억제 효과도 뛰어남을 알 수 있다.

<55> 또한, 본 발명은 상기 박태기나무 추출물 또는 이로부터 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 항산화용, 피부 노화 억제용, 피부 탄력 유지용 또는 주름 억제용 화장료 조성물을 제공한다.

<56> 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 박태기나무 추출물에서 분리한 활성성분은 화학식 1 (isoliquiritigenin), 화학식 2 (2',4'-dihydroxy-4-methoxychalcone), 화학식 3 (liquiritigenin), 화학식 4 (resveratrol), 화학식 5 (piceatannol), 화학식 6 (gallic acid), 화학식 7 (methyl gallate), 화학식 8 (ethyl gallate), 화학식 9 (myricetin), 화학식 10 (afzelin), 화학식 11 (quercitrin), 화학식 12 (myricitrin), 화학식 13 (myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside), 화학식 14 (syringetin-3-O-rutinoside), 화학식 15 (syringetin-3-O-2"-O-galloyl)-rutinoside), 화학식 16 ((+)-catechin), 화학식 17 ((-)-epicatechin-3-O-gallate), 화학식 18 ((-)-epigallocatechin-3-O-gallate), 화학식 19 ((-)-lyoniresinol 3a-O- β

-D-xylopyranoside) 및 화학식 20 ((+)-lyoniresiol 3a-O- β -D-glucopyranoside)로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택된 화합물인 것이 바람직하다.

- <57> 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 박태기나무 추출물 또는 이로부터 분리한 활성 성분은 과산화 저해 활성 및 라디칼 제거 활성이 우수하여 높은 항산화 활성을 가지며, 세포보호 효과, 세포수명 연장효과 등이 뛰어나 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지 또는 주름 개선을 위한 화장품 시료로서 이용될 수 있다.
- <58> 본 발명의 화장료 조성물은 유연 화장수, 영양 화장수, 영양크림, 엣센스, 팩 또는 목욕 용 파우더의 기초 화장품 시료 또는 피부 외용제형으로 이용될 수 있다.
- <59> 화장료 조성물의 제조시에 유상 성분의 함량은 유화 능력 보강 및 경제성 등을 고려하여 선택되며, 유상 성분으로서 주로 사용될 수 있는 오일로는 식물성 오일, 광물성 오일, 실리콘 유 및 합성유 중에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다. 이외에 유화 능력을 보강하기 위하여 계면활성제, 고급알코올 등을 0.1 내지 5 중량% 첨가할 수 있다. 이러한 계면 활성제로는 비이온 계면활성제와 같은 통상적인 계면활성제를 사용할 수 있으며, 고급 알코올로는 탄소수가 12 내지 20인 알코올을 단독으로 또는 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.
- <60> 또한, 화장료 조성물의 제조시에 수상 성분은 점도 또는 경도를 조절하기 위하여 카보머, 산탄검, 벤토나이트 등과 같은 1종 이상의 점증제를 0.001 내지 5 중량% 더 첨가할 수 있다.
- <61> 또한, 본 발명의 화장료 조성물에는 필요에 따라 고급 지방산, 비타민 등의 약효 성분과 자외선 차단제, 산화 방지제, 방부제, 향료, 착색제, pH 조절제 등 통상적인 화장품에서 사용되는 성분을 더 첨가할 수 있다.

- <62> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 본 발명의 박태기나무 추출물을 이용하여 유연화장수, 점조성액, 유액, 로션 및 크림을 제조하였다(표 9 내지 표 11 참조).
- <63> 본 발명의 박태기나무 추출물을 함유하는 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 박태기나무 추출물이 1 내지 15 중량%, 바람직하게는 2 내지 10 중량%의 양으로 첨가된다.
- <64> 또한, 본 발명은 상기 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 및 노화 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- <65> 본 발명의 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 및 노화 억제용 약학적 조성물은 활성산소에 의한 세포구성 성분의 산화에 의해 유발되는 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 질환으로는 예를 들면, 암, 노화, 관상 심장 질환, 고지방혈증, 동맥경화, 다발성 경화증, 자가면역성 뇌척수염, 뇌졸증, 알츠하이머 병 및 장염 등이 있으며, 반드시 여기에 한정되지는 않는다.
- <66> 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡셀제, 산제, 과립제, 혼탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화될 수 있다.
- <67> 구체적으로, 본 발명의 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면 정제, 트로치제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 또는 유성 혼탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)로

제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 봉해제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 유행유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.

<68> 또한, 본 발명의 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 박태기나무 추출물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 혼탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

<69> 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 가자 추출물을 2~200 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 10~100 mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하다.

<70> 또한, 본 발명은 상기 박태기나무 추출물의 제조 방법을 제공한다.

<71> 본 발명의 박태기나무 추출물은

<72> 1) 박태기나무의 분쇄물을 알코올로 조추출하는 단계;

- <73> 2) 상기 단계 1의 알코올 조추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 부탄을 순으로 추출하는 단계;
- <74> 3) 상기 단계 2의 에틸아세테이트 분획 또는 부탄을 분획을 수득하여 메탄올:물의 농도 구배로 컬럼 크로마토그래피를 실시하는 단계; 및
- <75> 4) 상기 단계 3의 항산화 활성 분획을 수득하여 컬럼 크로마토 그래피, TLC 또는 HPLC를 실시하여 최종 항산화 추출물을 수득하는 단계를 포함한다.
- <76> 단계 1에 있어서, 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올인 것이 바람직하며, 이중에서도 에탄올인 것이 바람직하다. 상기에서 에탄올은 60% 에탄올 인 것이 가장 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 0% 내지 100%의 농도의 박태기나무 에탄올 조추출물을 이용하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 60% 에탄올 조추출물의 활성이 가장 높았다(도 2 참조).
- <77> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <78> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정 되는 것은 아니다.
- <79> <실시예 1> 박태기나무로부터의 유효성분의 추출
- <80> <1-1> 제 1차 항산화 활성분획 분리
- <81> 박태기나무로부터 항산화 활성을 나타내는 유효성분을 추출하기 위해 도 1의 모식도에 나타낸 순서로 실험을 진행하였다. 구체적으로, 음건한 박태기나무의 잎과 줄기 1 kg을 마쇄

기로 갈아서 분말로 만들고 에탄올(EtOH)로 실온에서 2주간씩 2회 추출하였다. 이때 에탄올의 농도를 0%에서부터 순차적으로 10%씩 늘여 최종으로 100% 에탄올을 조제한 후 이를 이용해 추출하였다. 에탄올의 농도에 따른 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH(1,1-Diphenyl-2-Pycryl-Hydrazone, 이하 'DPPH'라 칭함) 방법을 수행하여 항산화 활성을 측정하였다(Taco, T. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, 58, 1780-1783; Na, M.K. ., *Nat. Prod. Sci.*, 2002, 8, 26-29). DPPH는 비교적 안정한 자유 라디칼로서, 라디칼 상태로 존재시 517 nm에서 최대 흡광도를 보이며 소거되면 흡광성을 잃기 때문에 이러한 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정할 수 있는 방법이다. 구체적으로, 박태기나무의 농도별 에탄올 추출물을 취해, DMSO(Sigma)를 이용하여 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석한 후, 96 웰 플레이트에 상기 용액 10 μl 씩을 각각 넣고 2 $\times 10^{-4}$ M/mL 에탄올 농도의 DPPH(Sigma, St. Louis, Mo, USA) 용액 190 μl 를 넣어 실온에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서 O.D값을 측정하였다. 대조구로는 시료 대신 DMSO를 가해 시료의 흡광도 감소 정도를 조사하였다. DPPH 라디칼 소거활성을 하기 수학식 1에 따라 계산하였으며, DPPH 라디칼을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC₅₀으로 정하였다.

<82> <수학식 1>

<83>

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성}(\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

<84>

A_{control}: 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

<85>

A_{sample}: 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

36> 그 결과, 추출시 사용한 에탄올의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거 활성은 증가 했으며, 0%, 10%, 20% 및 90% 에탄올 추출물은 라디칼 소거활성이 낮은 반면 정도의 차이는 있지만 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 및 100% 에탄올 추출물의 경우 대체적으로 라디칼 소거활성이 높았다. 특히, 60% 에탄올 추출물의 경우 추출물의 농도 증가에 따른 라디칼 소거활성이 가장 높았으며, IC₅₀ 값이 26.6으로 가장 낮아 에탄올 추출물 중에서 가장 높은 항산화 활성을 보이는 추출물임을 알 수 있었다(표 1 및 도 2).

37> 【표 1】

에탄올 농도	DPPH 라디칼 소거활성(%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
0%	2.4	2.9	8	16.8	33	75.2
10%	2.9	6.1	12.6	25	45.3	54.3
20%	3.7	8.4	16.3	32.2	56.1	43.3
30%	5.4	12.3	22.4	42.4	69.7	33.8
40%	6.5	13.2	25.9	47.4	77.9	29.8
50%	6.7	14	27.1	50.1	81.9	28.2
60%	7	15.6	28.5	53.6	85.3	26.6
70%	3.5	10.9	21.9	42	72.8	33.0
80%	4.2	11.4	23.1	46.9	78.9	30.2
90%	3	8.9	17.6	35.3	59.5	40.4
100%	4.1	10.7	21.7	47.4	70.7	32.7

38> 상기에서 60% 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성이 가장 높음을 확인한 후 이로부터 용매별 추출물을 수득하였다. 구체적으로, 60% 에탄올 추출물을 증류수로 혼탁시킨 후, 헥산(hexane)으로 3회 추출하고 감압 농축하여 헥산 분획(Fraction, 이하 'Fr'이라 약칭함) 11 g을 얻었고, 남은 혼탁액을 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EtOAc)로 3 회 추출하고 감압 농축하

여 에틸아세테이트 분획(이하 'EtOAc Fr'이라 칭함) 25 g을 얻었으며, 남은 혼탁액을 다시 수포화시킨 부탄올(butanol, BuOH)로 3 회 추출하고 감압 농축하여 부탄올 분획(이하 'BuOH Fr'이라 칭함) 19 g을 얻었다. 그리고 남은 분획 20 g은 물 분획으로 간주하였다(도 1).

<89> 상기에서 용매 추출한 헥산 Fr, EtOAc Fr 및 BuOH Fr으로부터 항산화 활성이 있는 분획을 찾기 위하여, 상기와 동일한 방법으로 각 분획별 추출물을 이용하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 이때, DPPH 라디칼 소거 활성이 높다고 알려져 있는 비타민 E를 비교군으로 사용하였다.

<90> 그 결과, EtOAc Fr과 BuOH Fr의 경우 IC₅₀ 값이 각각 24.0과 27.0 μg/ml로 나타나 비교군으로 사용했던 비타민 E(IC₅₀ 24.9 μg/ml)와 비슷한 정도의 강한 활성을 보였으나, 다른 분획들은 활성이 미약했다(도 3).

<91> <1-2> 제 2차 항산화 활성분획 분리

<92> 상기 실시예 <1-1>의 결과에 따라, 활성이 강한 EtOAc Fr 및 BuOH Fr에 대하여 하기와 같이 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 실시하고, 그 결과 수득된 각각의 분획에 대하여 다시 항산화 활성 실험을 수행하여 높은 활성을 보이는 분획만을 선택하였다.

<93> 먼저, EtOAC Fr(25 g)에 대하여 메탄올:물(1:4 → 1:0)을 이동상으로 YMC 컬럼 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 5 × 30 cm)를 실시하여 11개의 소분획(Fr.1~Fr.11)을 얻었다. 상기 11개의 소분획 중 Fr.1(3.6 g)을 다시 YMC 컬럼 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 3 × 30 cm)를 수행하여 5개의 소분획(Fr.1-1~Fr.1-5)을 얻었다. 이 중 Fr.1-1(450 mg)에 HPLC[컬럼:

μ BondapakTMC₁₈(3.9 × 300 mm, Waters), 이동상: ACN:0.1% TCA(16:18), 유속: 1 mL/분, UV: 280 nm]를 실시하여 체류시간(retention time, 이하 't_R'이라 칭함)이 각각 11.1분과 6.2분인 화합물 18 mg 및 21 mg의 화합물을 얻었으며 각각을 'CCEA111' 및 'CCEA112'라 명명하였다.

<94> 다음으로, Fr.1-2(500 mg)에 대하여 분취용 HPLC [YMC-Pack ODS-A 컬럼(20 × 250 mm), 이동상: 메탄올:물(3:7), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R이 16분인 화합물 77 mg 및 t_R이 24분인 화합물 19 mg을 얻어 각각을 'CCEA1211' 및 'CCEA1212'라 명명하였다.

<95> 다음으로, Fr.3(4.8 g)에 대하여 분취용 HPLC [YMC-Pack ODS-A 컬럼(20 × 250 mm), 이동상: ACN:0.1% TCA(25:75), 유속: 6 mL/분, detector: UV(280 nm)]를 실시하여 t_R이 24.5분인 화합물 19 mg을 얻어 'CCEA33'이라 명명하였다.

<96> 다음으로, Fr.4(4.0 g)는 이동상 클로로포름:메탄올(85:15)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(4 × 25 cm, 230-400 메쉬)를 실시하여 다시 6개의 소분획(Fr.4-1~Fr.4-6)으로 나누었으며, 이 중 Fr.4-1(320 mg)에 대하여 분취용 HPLC [이동상: 메탄올:물(35:65), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R이 25분인 화합물 30 mg을 얻어 이를 'CCEA413'이라 명명하고, Fr.4-4(1 g) 또한 분취용 HPLC[이동상: 메탄올:물(1:1), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R이 15분인 화합물 57 mg을 얻어 'CCEA442'라 명명하였다.

<97> 다음으로, Fr.6(2.2 g)은 이동상 클로로포름:메탄올(10:1)로 실리카겔 크로마토그래피(3 × 30 cm, 230-400 메쉬)를 실시하여 3개의 소분획(Fr.6-1~Fr.6-3)으로 나누었고, 이 중 Fr.6-2(200 mg)에 대하여 분취용 HPLC [이동상: 메탄올:물(1:1), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R이 20분인 화합물 25 mg을 얻어 이를 'CCEA622'라 명명하였다.

<98> 다음으로, Fr.8(2.1 g)에 대하여 이동상 용매로 클로로포름:메탄올(10:1)을 사용한 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 화합물을 20 mg을 얻어 이를 'CCEA82'라 명명하였다. 상기 CCEA82를 분리하고 남은 분획물을 메탄올에 녹여 재결정하여 수득한 화합물을 10 mg을 'CCEA83'이라 명명하였다.

<99> 다음으로, Fr.9(2.8 g)에 대하여 이동상 클로로포름:메탄올(15:1)로 실리카겔 크로마토그래피를 실시하여 2개의 소분획(Fr.9.1~Fr.9-2)로 나누었고, 이 중 Fr.9-1(220 mg)에 대하여 분취용 HPLC[이동상: 메탄올:물(4:1), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R 이 25분인 화합물을 32 mg을 얻고 이를 'CCEA913'이라 명명하였다(도 4).

<100> BuOH Fr(19 g)에 대해서도 메탄올:물(0:1→1:0)을 이동상으로 하여 YMC 젤 컬럼 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 5 × 30 cm)를 실시하여 8개의 소분획(Fr.1~Fr.8)을 얻었다.

<101> Fr.2(3.8 g)를 이동상 클로로포름:메탄올:물(70:30:5)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(3 × 30 cm, 230~400 mesh)를 실시하여 다시 5개의 소분획(Fr.2-1~Fr.2-5)으로 나누었으며, 이 중 Fr.2-3(420 mg)에 대하여 분취용 HPLC[이동상: 아세토니트릴:물(18:82), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 Fr.2-3-1 및 2-3-2를 얻고, 이중 Fr.2-3-1에 대하여 다시 분취용 HPLC[이동상: 아세토니트릴:물(10:90), 유속: 6 mL/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R 이 15분인 화합물을 32 mg을 얻고 이를 'CCBt231'이라 명명하였다.

<102> 다음으로, Fr.5(3 g)를 이동상 클로로포름:메탄올:물(70:30:5)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(3 × 30 cm, 230~400 메쉬)를 실시하여 다시 4개의 소분획(Fr.5-1~Fr.5-4)으로 나누었으며, 이 중 Fr.5-2(300 mg)에 대하여 분취용 HPLC [이동상: 메탄올:물(35:65), 유속: 6

ml/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R 이 25분인 화합물 20 mg 및 t_R 이 30분인 화합물 13 mg을 얻어 이를 각각 'CCBt521' 및 'CCBt522'이라 명명하였다. 또한, Fr.5-3(600 mg)에 대하여 30% 메탄올을 이동상으로 사용하고 YMC 젤 컬럼 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 3 × 30 cm)를 실시하여 다시 4개의 소분획(Fr.5-3-1 ~ Fr. 5-3-4)으로 분리하였으며, 이중 Fr.5-3-3으로부터 침전으로 생기는 물질을 정제하여 화합물 29 mg을 얻고, 이를 'CCBt533'이라 명명하였다.

03> 다음으로, Fr.6(3.2 g)을 다시 YMC 컬럼 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 3 × 30 cm)를 실시하여 4개의 소분획(Fr.6-1~Fr.6-4)을 얻었고, 이 중 Fr.6-2(370 mg)에 대하여 분취용 HPLC [이동상: 메탄올:물(3:7), 유속: 6 ml/분, UV: 254 nm]를 실시하여 t_R 이 26분인 화합물 9 mg 및 t_R 이 28분인 화합물 16 mg을 얻어 이를 각각 'CCBt622' 및 'CCBt623'이라 명명하였다. 또한, Fr.6-4(200 mg)에 대하여 분취용 HPLC(이동상: 메탄올:물(4:6), 유속: 6 ml/분)를 실시하여 t_R 이 18 분인 화합물 5 mg을 얻고 이를 'CCBt641'이라 명명하였다.

04> 다음으로, Fr.7(1.9 g)을 이동상 클로로포름:메탄올(4:1)로 실리카겔 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 3 × 30 cm)를 실시하여 4개의 소분획(Fr.7-1~Fr.7-4)을 얻었다. Fr.7-2(50 mg)을 다시 이동상 80% 메탄올로 세파텍스 LH-20 컬럼 크로마토그래피(컬럼 사이즈: 3 × 30 cm)를 실시하여 5개의 소분획(Fr.7-2-1 ~ Fr.7-2-5)으로 나누었고, 이중 Fr.7-2-2를 메탄올로 재결정하여 화합물 9 mg을 얻고 이를 'CCBt722'라 명명하였다. 또한, 침전으로 석출된 Fr.7-2-4를 정제하여 화합물 10 mg을 얻고 이를 'CCBt724'라 명명하였다(도 5).

105> <1-3> 분리된 화합물의 구조 분석

- 06> 상기 실시예 <1-2>에서 분리된 21가지의 분획물의 구조를 분석하였다. 구체적으로, 분리된 화합물의 융점은 전기적 온도 융점 분석기(electrothermal melting point apparatus)(Electrothermal Eng. Ltd., AZ 9003)를 사용하고, 선광도는 DIP-370 디지털 폴라리미터(polarimeter)(JASCO)를 사용하고, IR 스펙트럼은 IR 레포트-100 스펙트로포토미터(JASCO)를 사용하고, 질량분석은 텐덤 매스 스펙트로미터(Jeol, JMS HX-110/110A)를 사용하며, NMR 분석은 NMR 스펙트로포토미터(Bruker, NMR AMX-600 spectrometer)를 사용하고, 가스 크로마토그래피는 STAR 3400CX GC(Varian)을 사용하여 제조사의 방침에 따라 분석하였다. 분석된 융점, 선광도, IR 스펙트럼, 질량, NMR 분석 결과를 이용해 각 화합물의 구조를 결정하였다.
- 107> 그 결과, 구조 분석된 화합물은 하기 표 2에서 보는 바와 같이 칼콘계, 스틸벤계, 페놀릭계, 플라보놀계, 플라바놀계 및 리그난계로 표시되는 그룹으로 특정지어졌으며, 각각은 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물임을 알 수 있었다. 또한, 분석한 화합물 중에 화학식 15로 표시되는 화합물(syringetin-3-O-(2"-O-galloyl)-rutinoside)은 하기와 같은 특성을 가지며, 이를 통해 상기 화합물은 신규 화합물임을 알 수 있었다.
- 108> <화학식 15의 특성>
- 109> 엷은 노랑색 파우더,
- 110> FeCl₃, Mg-HCl, Zn-HCl 테스트: 양성,
- 111> 양성 FAB-MS: m/z 823[M + H]⁺
- 112> [α]_D -80 (c 0.1, MeOH)

13> IR ν_{max} cm^{-1} : 3400 (-OH), 1650 (C=O), 1610, 1500, 1455 (aromatic C=C), 1200, 1020 (glycosidic C-O)

14> UV λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 257 (3.60), 360 (3.82)

15> $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-*d*6) : 7.46 (2H, s, H-2, 6), 6.91 (2H, s, galloyl-2, 6), 6.48 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), 5.48 (1H, d, $J=7.2$ Hz, glc-1), 4.49 (1H, s, rham-1), 3.84 (6H, s, OMe-3, 5), 3.70 (1H, d, $J=10.2$ Hz, glc-6), 3.38 (1H, d, $J=10.2$ Hz, glc-6), 1.00 (3H, d, $J=5.0$ Hz, rham-6)

16> $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-*d*6) : 156.3 (C-2), 133.1 (C-3), 177.3 (C-4), 161.1(C-5), 98.6 (C-6), 164.0 (C-7), 93.9 (C-8), 156.4 (C-9), 104.0 (C-10), 119.7 (C-1), 106.9 (C-2, 6), 147.4 (C-3, 5), 138.6 (C-4), 100.8 (glc-1), 76.4 (glc-2), 74.9 (glc-3), 70.1 (glc-4), 74.3 (glc-5), 66.7 (glc-6), 101.0 (rha-1), 70.2 (rha-2), 70.5 (rha-3), 71.7 (rha-4), 68.3 (rha-5), 17.6 (rha-6), 165.3 (C=O), 120.4 (galloyl-1), 108.7 (galloyl-2, 6), 145.3 (galloyl-3, 5), 137.9 (galloyl-4).

17>

【표 2】

분류	분획물	화합물
찰콘계 (chalcones)	CCEA82	화학식 1(isoliquiritigenin)
	CCEA83	화학식 2(liquiritigenin)
	CCEA913	화학식 3(2',4'-dihydroxy-4-methoxychalcone)
스틸벤계 (stilbenes)	CCEA622	화학식 4(piceatannol)
	CCEA442	화학식 5(resveratrol)
페놀릭계 (phenolics)	CCBt231	화학식 6(gallic acid)
	CCEA1212	화학식 7(methyl gallate)
	CCEA33	화학식 8(ethyl gallate)
플라보놀계 (flavonols)	CCEA413	화학식 9(myricetin)
	CCBt722	화학식 10(afzelin)
	CCBt623	화학식 11(quercitrin)
	CCBt622	화학식 12(myricitrin)
	CCBt641	화학식 13(myricetin-3-O-(2"-O-gallyl)- α -L-rhamnopyranoside)
	CCBt533	화학식 14(syringetin-3-O-rutinoside)
	CCBt724	화학식 15(syringetin-3-O-(2"-O-gallate)
플라바놀계 (flavanols)	CCEA1211	화학식 16((+)-catechin)
	CCEA111	화학식 17((-)-epicatechin-3-O-gallate)
	CCEA112	화학식 18((-)-epigallocatechin-3-O-gallate)
리그난계 (lignans)	CCBt521	화학식 19((-)-lyoniresiol 3a-O- β -D-xylopyranoside)
	CCBt522	화학식 20((+)-lyoniresiol 3a-O- β -D-glucopyranoside)

118> <실시예 2> DPPH 라디칼 소거 활성(DPPH radical scavenging activity)의 측정

119> 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물

을 포함하는 추출물들의 항산화 활성을 측정하기 위하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로

DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. 이때, 합성 항산화제인

BHA(tert-butyl-4-hydroxyanisole) 및 α -토코페롤(α -tocopherol)을 양성 대조군으로 사용하였다.

- 10> 그 결과, 페놀릭산(phenolic acids) 및 플라보노이드(flavonoid) 화합물들이 농도-의존적으로 강한 라디칼 소거활성을 나타내었으며, 스틸벤(stilbene) 화합물도 비교적 강한 라디칼 소거활성을 나타내었다. 특히, 갈릭산(gallic acid)을 비롯한 갈로일 에스터(galloyl ester)들이 강한 활성을 나타내었는데, 구체적으로는 화학식 6(gallic acid), 화학식 7(methyl gallate), 화학식 8(ethyl gallate), 화학식 17((-)-epicatechin-3-O-gallate), 화학식 18((-)-epigallocatechin-3-O-gallate) 및 화학식 13(myricetin-3-O-(2-O-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside)의 IC₅₀ 값은 각각 5.1 ± 0.4, 5.3 ± 0.3, 7.0 ± 1.1, 6.8 ± 0.5, 6.7 ± 0.4 및 8.6 ± 0.7 g/mL로 상기 화합물들 간에 현저한 활성의 차이는 없었지만, 이들 화합물 모두는 양성 대조군으로 사용했던 α -토코페롤(IC₅₀ 25.4 ± 0.9 g/mL) 및 BHA(IC₅₀ 15.3 ± 0.6 g/mL) 보다 현저하게 강한 라디칼 소거활성을 나타내었다(표 3).
- 121> 벤젠 링(Benzene ring)의 *ortho*-위치에 전자 공여 그룹(electron donating group)이 치환되어 있으면 페녹시(phenoxy) 라디칼을 쉽게 안정화 시킬 수 있으므로 라디칼 소거 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다(Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 324-325 (1992); Kikuzaki, H., et al., *J. Agric. Food Chem.* 50: 2161-2168 (2002)). 갈로일(Galloyl)그룹의 경우 3개의 하이드록실 그룹이 인접한 위치에 치환되어 있어 효과적으로 페녹시 라디칼을 안정화 시킬 수 있으므로 강력한 라디칼 소거활성을 나타내는 것으로 사료된다. 표 3에서 보는 바와 같이 갈로일 에스터 이외에도 화학식 16((+)-catechin), 화학식 9(myricetin), 화학식 10(afzelin), 화학식 11(quercitrin), 화학식 12(myricitrin) 등의 플라보노이드계 화합물도 강한 라디칼 소거활성을 나타내었는데, 이는 플라보노이드 구조

중에 생성된 폐녹시 라디칼을 효과적으로 안정화 시킬 수 있는 폐놀릭 치환기가 있기 때문으로 생각할 수 있다. 즉, 전자-공여 능력이 큰 치환기를 가진 화합물 일수록 라디칼 소거활성이 증가하는 결과를 보여주었는데, 이것은 페카리넨(Pekkarinen) 등의 보고와도 일치하였다 (Pekkarinen, S.S., et al., *J. Agric. Food Chem.* 47: 3036-3043 (1999)).

22> 【표 3】

분류	화합물	DPPH 라디칼 소거활성 $IC_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$
찰콘계 (chalcones)	화학식 1	>50
	화학식 2	>50
	화학식 3	>50
스틸벤계 (stilbenes)	화학식 4	20.9 ± 1.3
	화학식 5	39.5 ± 2.8
페놀릭계 (phenolics)	화학식 6	5.1 ± 0.4
	화학식 7	5.3 ± 0.3
	화학식 8	7.0 ± 0.0
플라보놀계 (flavonols)	화학식 9	7.3 ± 0.3
	화학식 10	33.4 ± 0.6
	화학식 11	12.4 ± 0.6
	화학식 12	11.6 ± 0.4
	화학식 13	8.6 ± 0.7
	화학식 14	35.1 ± 0.5
	화학식 15	29.2 ± 0.8
플라바놀계 (flavanols)	화학식 16	15.6 ± 0.8
	화학식 17	6.8 ± 0.5
	화학식 18	6.7 ± 0.4
리그난계 (lignans)	화학식 19	45.7 ± 4.0
	화학식 20	42.6 ± 3.1
양성대조군	α-토코페롤 BHA	25.4 ± 0.9 15.3 ± 0.6

123> <실시예 3> 지질 과산화 억제 활성(Lipid peroxidation inhibitory activity) 측정

24> 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 지질 과산화 억제 활성을 측정하였다. 지질의 산화는 지질 하이드로퍼옥사이드(lipid hydroperoxides), 컨쥬게이트된 지방산(conjugated fatty acids, HODEs), 에폭시 지방산(epoxy fatty acids), 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA), 4-하이드록시노네날(4-hydroxynonenal, 4-HNE) 등의 산화물을 생성시켜 세포를 구성하는 생체막을 직접 손상시키거나 다른 세포 구성성분과 2차적인 반응을 일으켜 여러 가지 퇴행성질환 및 노화 과정의 중요한 원인으로 알려져 있다(Esterbauer, H. et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, 11:81-128; Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., *Methods Enzymol.*, 1990, 186:407-421; Jira, W., et al., *Chem. Phys. Lipids*, 1996, 84:165-173; Jira, W. et al., *Biosci*, 1998, 53:1061-1071). 일반적으로, 미토코드리아나 마이크로좀 등 세포내 전자전달계에서 생성된 슈퍼옥사이드 라디칼은 체내 효소반응을 통하여 H_2O_2 로 전환되며 이는 다시 카탈라제나 글루타치온 퍼옥시다제와 같은 효소에 의해 독성이 없는 물로 변환된다. 하지만, 여러 가지 요인에 의해 체내 활성산소가 많이 생성되면 H_2O_2 는 펜톤(Fenton) 반응($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO\cdot + HO^-$)이나 메탈-카탈리즈된 하버-웨이스 반응(metal-catalysed Haber-Weiss reaction)($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO\cdot + HO^-$)을 통해 반응성이 큰 하이드록실 라디칼($HO\cdot$)을 발생시켜 지질과산화물을 생성시키고 이것은 다시 체내 금속이온과 반응하여 지질 라디칼($L\cdot$)이나 지질 퍼옥시 라디칼($LOO\cdot$)을 유도하여 지질과산화 연쇄반응을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다(Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1999; Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Biochem. J.*, 1999, 219:1-14; Harman, D., *Free radical theory of aging*. Alan R Liss, New York, 1986, 3-49;

Stadtman, E.R., Levine, R.L., *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000, 899:191-208). 그러므로, 전자 공여 능력이 있는 화합물은 결과적으로 지질의 과산화를 억제할 수 있는 것으로 받아들여진다.

125> 지질 과산화 억제 활성을 측정하는 것은 Fe^{2+} /아스코르브산 반응계에 의하여 최종 생성된 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical)이 지질을 산화시켜 생성되는 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA)를 티오바비투릭산(thiobarbituric acid, 이하 'TBA'라 칭함)과 반응시켜 분광학적 방법으로 정량하는 것이다. 구체적으로, 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물 시료 각각 10 μl 과 10 mg 단백질/ ml 농도의 쥐의 뇌 균질화물(Rat brain homogenate) 50 μl 및 50 mM 포스페이트 버퍼(phosphate buffer, pH 7.4) 740 μl 를 섞은 후 0.1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 1 mM 아스코르브산(ascorbic acid) 혼합액 200 μl 를 넣어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 상기 반응액에 20% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, 이하 'TCA'라 칭함)(Sigma) 250 μl 를 가하여 반응을 정지시킨 후 1% TBA(Sigma) 250 μl 를 가하고 100°C에서 10분간 반응시켰다. 상기 반응액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 지질과산화 억제 활성을 하기 수학식 2에 따라 산출하였으며, 지질과산화 반응을 50% 억제시키는 농도를 IC_{50} 으로 하였다. 비교군으로는 α -토코페롤 및 BHA를 사용하였으며 대조군으로는 시료 및 용액을 아무것도 첨가하지 않은 것을 사용하였다.

$$\text{지질과산화 억제활성} (\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

【수학식 2】

127> A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도

128> A_{sample} : 시료를 첨가한 반응군의 흡광도

- 39> A_{blank}: 시료, TCA 및 TBA 용액을 첨가하지 않은 흡광도
- 30> 그 결과, 플라보노이드계, 스틸벤계 및 페놀릭산계 화합물들이 농도-의존적으로 강한 지질과산화 억제활성을 나타내었다. 특히, 스틸벤계의 화학식 5(piceatannol)은 IC₅₀ 값이 0.09 ± 0.01 g/ml로서 강력한 지질과산화 억제제로 알려져 있는 BHA(IC₅₀ 0.11 ± 0.02 g/ml)와 비슷한 정도의 강한 활성을 나타내었다. 또한, 활성을 검색한 대부분의 플라보노이드계 화합물들이 강한 지질과산화 억제활성을 나타내었는데, 구체적으로는 화학식 9(myricetin), 화학식 17((-)-epicatechin-3-O-gallate), 화학식 18((-)-epigallocatechin-3-O-gallate), 화학식 11(quercitrin), 화학식 12(myricitrin) 및 화학식 13(myricetin-3-O-(2-O-galloyl)-a-L-rhamnopyranoside)의 IC₅₀ 값이 각각 0.95 ± 0.06, 2.9 ± 0.06, 1.0 ± 0.08, 6.21 ± 0.40, 5.27 ± 0.32 및 4.73 ± 0.41 g/ml로 나타나 양성 대조군으로 사용했던 a-토코페롤 보다 현저하게 강한 지질과산화 억제활성을 나타내었다(표 4). 지질과산화 억제 활성의 경우도 상기 실시예 2에서 실시한 DPPH 라디칼 소거활성 결과와 같이, 벤젠 맹에 전자-공여 그룹이 많이 치환되어 있을수록 페녹시 라디칼을 쉽게 안정화시키기 때문에 활성이 증가한다고 사료되었다. 특히, 플라보노이드계 화합물의 구조는 효과적으로 페녹시 라디칼을 안정화 시킬 수 있을 뿐만 아니라 금속이온을 퀼레이트화 시킬 수 있으므로 강력한 지질과산화 억제활성을 나타내는 것으로 사료되었다.

【표 4】

분류	화합물	지질파산화 억제활성 $IC_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$
찰콘계 (chalcones)	화학식 1	3.33 ± 0.50
	화학식 2	12.81 ± 0.86
	화학식 3	6.05 ± 0.99
스틸벤계 (stilbenes)	화학식 4	0.89 ± 0.10
	화학식 5	0.09 ± 0.01
페놀릭계 (phenolics)	화학식 6	6.80 ± 0.63
	화학식 7	7.05 ± 0.87
	화학식 8	7.01 ± 0.62
플라보놀계 (flavonols)	화학식 9	0.95 ± 0.06
	화학식 10	10.25 ± 0.91
	화학식 11	6.21 ± 0.40
	화학식 12	5.27 ± 0.32
	화학식 13	4.73 ± 0.41
	화학식 14	19.0 ± 0.52
	화학식 15	10.10 ± 0.02
플라바놀계 (flavanols)	화학식 16	4.71 ± 0.26
	화학식 17	2.90 ± 0.06
	화학식 18	1.00 ± 0.08
리그난계 (lignans)	화학식 19	37.42 ± 2.06
	화학식 20	39.10 ± 3.11
양성대조군	α-토코페롤 BHA	6.61 ± 0.95 0.11 ± 0.02

132) <실시예 4> 하이드록실 라디칼 소거 활성(Hydroxyl radical scavenging activity) 및 나이트

릭 옥사이드(nitric oxide) 소거활성 측정

133) 하이드록실 라디칼(HO^{\cdot})은 체내 금속이온 또는 슈퍼옥사이드 라디칼과 반응하여 생성되는데, 반응성이 매우 커서 직접적으로 체내 단백질, 지질 및 DNA의 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO^{\cdot}) 또한 슈퍼옥사이드 라디칼과 반응하여 반응성이 강한 퍼록시 나이트라이트(ONOO^{-})를 생성함으로써 하이드록실 라디칼과 비슷한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Yan, L.J., Sohal, R.S., *Free Radic. Biol. Med.*, 2000,

29:1143-1150). 이에, 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 할리웰의 방법(Halliwell, B. et al., Anal Biochem., 1987, 165, 215-219)에 따라 하이드록실 라디칼 제거 활성을 측정하였다. 구체적으로, 화합물을 DMSO에 녹인 시료 10 μl , 포스페이트 버퍼(20 mM, pH 7.4), 데옥시리보스(deoxyribose) 5.6 mM, FeCl₃ 0.1 mM, H₂O₂ 1 mM 및 아스코르브산 0.1 mM을 혼합하여 1 mL로 되게 하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 상기 반응액에 20% TCA 250 μl 및 1% TBA 용액(50 mM NaOH에 녹임) 250 μl 를 첨가하여 95°C에서 5분동안 열반응시켰다. 상기 반응 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 하이드록실 라디칼 소거 활성은 하기 수학식 3에 따라 계산하였다. 양성 대조군으로는 BHA 및 α -토코페롤을 사용하였다.

<134>

$$\text{하이드록실 라디칼 소거 활성} (\%) = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control} - A_{blank}} \times 100$$

【수학식 3】

<135>

 $A_{control}$: 대조구 웰의 흡광도

<136>

 A_{sample} : 시료를 첨가한 반응구 웰의 흡광도

<137>

 A_{blank} : 시료, TCA 및 TBA 용액을 첨가하지 않은 웰의 흡광도

<138>

하이드록실 라디칼 소거활성을 검색한 결과, 플라보노이드계, 스틸벤계 및 페놀릭산계 화합물들은 대조군과 비교하여 12.7 내지 54.0% 정도의 소거활성을 나타내었다. 특히, 화학식 17((-)-epicatechin-3-

O-gallate), 화학식 18((-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate), 화학식 7(methyl gallate), 화학식 8(ethyl gallate) 및 화학식 13(myricetin-3-*O*-(2-*O*-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside) 등 갈로일 그룹이 치환된 화합물들이 강한 하이드록실 라디칼 소거활성을 나타내었다(표 5).

39> 또한, 나이트릭 옥사이드 소거활성을 검색한 결과, 화학식

18((-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate), 화학식 17((-)-epicatechin-3-*O*-gallate), 화학식 16((+)-catechin), 화학식 9(myricetin) 등이 비교적 강한 활성을 나타내었다(표 5).

40> 【표 5】

분류	화합물	하이드록실 라디칼 소거활성%	나이트릭 옥사이드 소거활성%
찰콘계 (chalcones)	화학식 1	6.1	
	화학식 2	4.5	
	화학식 3	3.2	
스틸벤계 (stilbenes)	화학식 4	9.4	26.5 ± 4.4
	화학식 5	12.7	30.8 ± 2.9
페놀릭계 (phenolics)	화학식 6	33.6	25.0 ± 2.0
	화학식 7	43.8	32.6 ± 2.8
	화학식 8	44.0	33.4 ± 2.1
플라보노이드계 (flavonoids)	화학식 9	8.7	25.9 ± 0.8
	화학식 10	3.0	5.9 ± 0.5
	화학식 11	16.6	10.2 ± 1.0
	화학식 12	19.5	11.9 ± 0.9
	화학식 13	45.4	23.0 ± 0.6
	화학식 14	10.2	6.0 ± 0.8
	화학식 15	16.4	14.1 ± 1.4
플라바노이드계 (flavanols)	화학식 16	12.7	16.9 ± 1.1
	화학식 17	39.9	25.4 ± 1.2
	화학식 18	54.0	26.2 ± 0.9
리그난계 (lignans)	화학식 19	7.3	0.8 ± 0.6
	화학식 20	8.1	0.8 ± 0.8
양성대조군	α -토코페롤 BHA	0.8 15.6	

- 1) <실시예 5> 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성(Superoxide radical scavenging activity) 측정
- 2) 슈퍼옥사이드 라디칼(Superoxide radical, O_2^-) 자체는 반응성이 비교적 약하지만, 쉽게 H_2O_2 로 변환되어 결국, 반응성이 강한 하이드록실 라디칼을 생성하거나, 나이트릭 옥사이드(nitric oxide, $NO\cdot$)와 반응하여 반응성이 강한 퍼록시 나이트라이트(peroxy nitrite, $ONOO^-$)를 생성하여 SH-그룹의 산화, 단백질 티로신의 질산화(nitration), 지질과산화, DNA 손상 등을 일으키는 원인이 된다. 이에, 상기 실시예 1에서 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 다른 유해 활성산소류의 전구물질로 작용하는 슈퍼옥사이드 라디칼(Superoxide radical, O_2^-)의 소거 활성을 측정하였다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성은 슈퍼옥사이드를 디스뮤테이션(dismutation) 시킴으로써 슈퍼옥사이드를 소거하는 효소인 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD)의 활성을 측정하여 검색할 수 있으며, 본 발명에서는 크산틴/xanthine 산화 효소(xanthine/xanthine oxidase)의 효소반응에 의한 슈퍼옥사이드 발생 및 니트로 블루 테트라졸리움(nitro blue tetrazolium, 이하 'NBT'라 칭함)가 환원되어 포르마잔(formazan)이 생성되는 반응($NBT + 2O_2^- \rightarrow NBTH_2 + 2O_2$)에 대한 시료의 억제 정도를 측정하였다. 구체적으로, 96 웰 플레이트에 4 mM 크산틴(xanthine, Sigma) 50 μ l, 250 mM NBT(Sigma) 50 μ l, 50 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.8, 1mM EDTA) 50 μ l 및 시료 10 μ l를 넣은 후 크산틴 산화효소(Sigma) 40 μ l를 넣어 반응시켰다. 상기 반응 후 시간별로 각 반응액을 수거하여 ELISA 측정기로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 슈퍼옥사이드 라디칼 소거활성은 하기 수학식 4에 나타난 바와 같이 대조구에 대한 NBT의 환원 감소 정도로써 산출하였으며, 슈퍼옥사이드 라디칼을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC₅₀으로 하였다. 양성대조군으로는 a-토코페롤 및 카페익산(caffeic acid)을 사용하여 항산화 효과를 비교하였다.

13>

$$\text{슈퍼옥사이드 라디칼 소거 활성} (\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

【수학식 4】

14> A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 대조구 웰의 흡광도15> A_{sample} : 시료를 첨가한 반응구 웰의 흡광도46> A_{blank} : 시료 및 NBT 용액을 첨가하지 않은 웰의 흡광도

47> 그 결과, 플라보노이드계, 스틸벤계 및 페놀릭산계 화합물들이 농도-의존적으로 강한 슈퍼옥사이드 라디칼 소거활성을 나타내었다. 특히, 플라반-3-올(epavan-3-ol)의 화학식 17((-)-epicatechin-3-O-gallate), 화학식 18((-)-epigallocatechin-3-O-gallate) 및 화학식 15(myricetin-3-O-(2-O-galloyl)-a-L-rhamnopyranoside)의 IC₅₀ 값은 각각 11.9 ± 2.1, 24.0 ± 3.5 및 13.2 ± 2.5 g/ml로서 강력한 슈퍼옥사이드 라디칼 소거제로 알려져 있는 카페익산(caffeiic acid)(IC₅₀ 11.0 ± 1.8 g/ml)과 비슷한 정도의 강한 활성을 나타내었다. 또한, 플라보노이드계 및 페놀릭산계 화합물들이 강한 슈퍼옥사이드 라디칼 소거활성을 나타내었는데, 화학식 9(myricetin), 화학식 16((+)-catechin), 화학식 7(methyl gallate) 및 화학식 8(ethyl gallate)의 IC₅₀ 값은 각각 12.1 ± 1.1, 16.5 ± 2.0, 16.5 ± 1.4 및 15.8 ± 1.6 g/ml 정도로서 강한 활성을 나타내었다. 하지만, 캐콘계 화합물의 경우는 비교적 활성이 약하게 나타났다. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거활성의 경우도, 슈퍼옥사이드와 반응하여 생성된 페녹시 라디칼을 쉽게 안정화 시킬 수 있는 구조를 가진 화합물들이 좋은 활성을 나타내었다. 특히, 갈로일 그룹이 치환된 화합물이 강한 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(표 6).

8> 【표 6】

분류	화합물	지질과산화 억제활성 $IC_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$
찰콘계 (chalcones)	화학식 1	47.6 ±4.0
	화학식 2	49.8 ±3.1
	화학식 3	59.2 ±3.8
스틸벤계 (stilbenes)	화학식 4	45.3 ±1.9
	화학식 5	12.1 ±1.7
페놀릭계 (phenolics)	화학식 6	34.1 ±2.4
	화학식 7	16.5 ±1.4
	화학식 8	15.8 ±1.6
플라보놀계 (flavonols)	화학식 9	12.1 ±1.1
	화학식 10	50.2 ±3.4
	화학식 11	32.1 ±2.0
	화학식 12	29.7 ±1.8
	화학식 13	13.2 ±2.5
	화학식 14	45.2 ±2.2
	화학식 15	37.1 ±2.0
플라바놀계 (flavanols)	화학식 16	16.5 ±2.0
	화학식 17	11.9 ±2.1
	화학식 18	24.0 ±3.5
리그난계 (lignans)	화학식 19	>100
	화학식 20	>100
양성대조군	카페인 BHA	11.0 ±1.8 48.8 ±2.5

149> <실시예 6> *t*-부틸하이드로페온사이드로 유도되는 산화적 손상에 대한 세포보호 활성

150> *t*-부틸하이드로페온사이드는 세포에 들어가서 자유 라디칼 중간체(intermediate)로 대사되어 지질과산화를 유발시켜 결국 세포 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상은 세포와 조직에서 일어나는 산화적 스트레스와 유사하므로, 실질적인 의미에서 산화적 스트레스에 의한 노화 억제를 평가할 수 있는 유용한 방법이다. 신생아 표피 세포인 HEK-N/F 세포에 *t*-부틸하이드로페온사이드 1.5 mM을 3시간 동안 처리한 결과, 세포의 생존율이 11.2 ±1.2%정 도로 현저히 감소된 반면, 분리된 화합물을 50.0 g/mL의 농도로 함께 처리하였을 때에는 현저

한 세포보호 활성을 나타내었다. 특히, 화학식 5(piceatannol)를 병용처리 했을 때 세포 생존율이 $84.7 \pm 6.9\%$ 로서 가장 강한 활성을 나타내었으며, 화학식 9(myricetin), 화학식 11(quercetin) 등의 플라본 3-올 화합물도 각각 $61.0 \pm 4.5\%$ 와 $48.1 \pm 5.7\%$ 의 세포 생존율을 나타내었다. 또한, 화학식 6(gallic acid), 화학식 7(methyl gallate), 화학식 8(ethyl gallate) 등도 각각 $41.5 \pm 3.1\%$, $43.0 \pm 5.6\%$, $43.1 \pm 4.1\%$ 정도의 세포보호 활성을 나타내었다. 상기 결과를 통해 본 발명의 박태기나무 추출물에서 수득한 화합물은 세포의 산화적 스트레스를 효과적으로 억제하여 과산화에 의한 세포 사멸을 억제하는 것으로써 산화적 스트레스에 의한 노화를 억제 시킬 수 있음을 확인하였다.

151> 【표 7】

분류	화합물	세포생존율 (%)	TBARS (pmol/mg 단백질)
찰콘계 (chalcones)	화학식 1	13.9 ± 2.6	5118.1 ± 10.5
	화학식 2	16.2 ± 3.2	3449.7 ± 305.8
	화학식 3	12.1 ± 0.0	8255.1 ± 76.4
스틸벤계 (stilbenes)	화학식 4	18.1 ± 6.6	2792.4 ± 259.1
	화학식 5	84.7 ± 6.9	520.2 ± 60.7
페놀릭계 (phenolics)	화학식 6	41.5 ± 8.1	1245.7 ± 12.4
	화학식 7	43.0 ± 5.6	1024.4 ± 91.9
	화학식 8	43.1 ± 1.1	1115.6 ± 6.2
플라보노이드계 (flavonoids)	화학식 9	61.0 ± 4.5	810.7 ± 7.0
	화학식 10	16.8 ± 3.3	3295.1 ± 304.5
	화학식 11	21.4 ± 9.9	2217.2 ± 200.3
	화학식 12	25.4 ± 7.7	1852.6 ± 26.8
	화학식 13	45.1 ± 3.6	1019.8 ± 54.0
	화학식 14	20.0 ± 2.6	2928.1 ± 209.9
	화학식 15		
플라바노이드계 (flavanols)	화학식 16	24.5 ± 9.9	1912.4 ± 12.0
	화학식 17	49.4 ± 6.4	1007.3 ± 95.2
	화학식 18	46.6 ± 5.9	1032.6 ± 03.5
리그난계 (lignans)	화학식 19	13.5 ± 2.0	5981.1 ± 12.6
	화학식 20	12.9 ± 1.1	7635.7 ± 631.2
대조군	t-부탄올	11.2 ± 2.2	984.0 ± 95.2

i2) <실시예 7> UV 조사로 유도되는 산화적 스트레스에 대한 보호 활성

i3) <7-1> UV 조사에 대한 세포보호 효과(*in vitro*)

i4) UV 조사는 세포내 활성산소를 현저히 증가시켜 DNA 손상, DNA-단백질 연결 등을 유발한다. HEK-N/F 세포에 35 mJ/cm²의 UVB를 조사하면 핵의 DNA 사슬이 끊어지는데, 이것을 DNA 가닥 인터킬레이팅(intercalating) 형광염료인 에티듐 홉모다이머(Et2)와 결합시킨 후 형광의 세기를 측정함으로써 정량하였다. 구체적으로, HEK-N/F 세포를 무혈청 KGM 배지(Clonetics)에 넣고 배양시킨 후 24-웰 플레이트에 0.5 내지 4 × 10⁴ 세포수/2 cm²가 되도록 접종 시켰다. 세포를 18시간 동안 배양시킨 후 2시간 동안 시료를 처리하였다. PBS로 세척한 후 UV 검출기(Spectronics UV transilluminator EBF-260, the maximal wavelength, 312 nm; a half-peak intensity range, 297-328 nm)을 이용하여 세포에 UV를 조사하였다. UV 조사된 세포를 1-7시간 배양시키고 5 M 에티듐 홉모다이머(Et2, Millipore)를 투여했다. 30분 후 밀리포어 마이크로플레이트 프루오로미터 사이토플루오로 2350(Millipore microplate fluorometer Cytofluor 2350, excitation: 485 nm, emission: 645 nm)을 이용하여 형광을 측정하였다.

i55) 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타낸 바와 같이, 박태기나무 추출물, 화학식 9(myricetin) 및 화학식 5(piceatannol)을 처리하였을 때에는 대조군의 형광보다 각각 54.7% 및 66.7% 정도 낮은 형광을 나타내었다. 즉, 박태기나무 추출물 및 이들로부터 분리한 활성성분은 UV에 의한 산화적 스트레스를 억제하여 DNA 손상을 현저히 감소시켰다.

i56) <7-2> UV 조사에 대한 피부조직 보호 효과(*in vitro*)

- > 5-6주령 된 암컷 무모쥐(hairless mouse, SKH-hr-1)를 온도 24 ℃, 상대습도 50 ± 10%, 12시간 낮/밤의 사이클로 14일 정도 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험하기 30-60분 전에 시료를 무모쥐의 5개의 지점에 피하주사한 후 쥐의 등에 UVB를 조사시켰다. 다음으로 20 × 15 × 5 cm 케이지에 한 그룹 당 5마리의 쥐를 넣고 15 cm의 거리에서 UV 램프(HP-15M, 280-400 nm, max. 312 nm; Atto Co., Japan)로 제곱미터 당 15 kJ이 되도록 UVB를 조사하였다. UVB를 24시간 동안 조사한 후 등쪽의 피부를 잘라 과산화 측정시까지 -70℃에서 보관하였다.
- 58> UVB 조사는 피부 조직에서 현저한 지질과산화를 유발시키므로, 과산화된 지질의 함량을 측정함으로써 피부의 손상 정도를 측정할 수 있다. 이에 지질과산화를 측정하였다. 구체적으로 SKH-1 무모쥐의 등 표면에 UVB를 조사하고 48시간 후에 등의 피부조직을 잘라 티오바비튜릭산(thiobarbituric acid, TBA)법으로 지질과산화를 측정하였다. 무모 쥐의 등쪽 피부를 10배의 50 mM K-P 완충액에 넣은 후, 균질화(homogenation)시켰다.
- 59> 다음으로 하이드로젠 페옥사이드를 관찰하였다. 냉동시킨 등의 피부 절편을 1 mg/ml 글루코스와 1 mg/ml 디아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB)을 함유하는 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 넣고 37℃에서 5 내지 6시간 동안 배양하였다. 증류수로 세척한 후 2% 메틸 그린(methyl green)으로 60분간 염색하였다. 현미경으로 갈색의 DAB-페옥시다제와 파란색으로 염색되는 핵을 관찰하였다.
- 160> UV 조사는 피부조직에서 활성산소종의 생성을 유도하여 DNA 손상, 단백질의 산화, 지질과산화 등을 유발 시켜 결국, 염증이나 암, 피부노화 같은 피부의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 도 7에서 나타난 바와 같이 90 mJ/cm²으로 UVB를 조사하였을 때에는 현저한 피부 손상이 관찰되었다. 하지만, 박태기나무 추출물 및 화학식 5(piceatannol)을 50 mg/kg의

농도로 전처리 하였을 때에는 SKH-1 무모쥐의 피부손상이 현저히 억제되었다. 상기 실시예의 결과에서 알 수 있듯이 박태기나무 추출물 및 그의 활성 성분인 화학식 5(piceatannol)는 강력한 라디칼 소거활성, 지질파산화 억제활성 및 산화적 스트레스에 대한 피부세포의 보호활성을 나타내었으므로, UVB 조사로 유도되는 피부 손상에 대한 보호 효과는 이러한 항산화 활성에서 기인할 것으로 사료되었다. 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine, DAB)은 조직의 펴옥시다제와 반응하여 진한 갈색의 DAB-페옥시다제를 생성하므로 이를 이용해 UVB 조사에 의해 생성되는 H₂O₂를 관찰하였다. 도 7에서 나타난 바와 같이 90 mJ/cm²로 UVB를 조사하였을 때에는 진한 갈색의 DAB-페옥시다제가 많이 관찰되었지만, 박태기나무 추출물 및 화학식 5(piceatannol)을 50 mg/kg의 농도로 전처리 하였을 때에는 SKH-1 무모쥐의 피부 조직에서 H₂O₂ 생성이 현저히 억제되었다.

- 61> 지질파산화를 측정한 결과, UVB를 조사한 군의 평균 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) 함량은 약 0.68 nmol/mg 단백질로서 UVB를 조사하지 않은 대조군(0.32 ± 0.05 nmol/mg 단백질)에 비해 2배 정도 지질파산화가 일어났다 (표 8). 박태기나무 추출물 및 화학식 5(piceatannol)를 처리한 군은 농도-의존적으로 피부의 지질파산화가 감소되었다. 특히, 화학식 5는 같은 농도에서 양성 대조군으로 사용했던 MAP(magnesium-L-ascorbyl-2-phosphate)보다도 높은 활성을 나타내었다.

【표 8】

처리군	처리량 (mg/kg)	TBARS (nmol/mg 단백질)
대조군	0	0.32 ± 0.05
UVB 조사	0	0.68 ± 0.1
박태기나무 추출물 + UVB 조사	50 30 10	0.21 ± 0.10 0.34 ± 0.09 0.64 ± 0.10
화학식 5 + UVB 조사	30 10	0.07 ± 0.03 0.16 ± 0.08
MAP + UVB 조사	50 30	0.16 ± 0.05 0.28 ± 0.06

63> <실시예 8> 세포 수명에 대한 연장 효과

64> HEK-N/F 세포들은 피부의 또 다른 주성분인 섬유아세포를 유리딘 브로마이드(uridine bromide)로 처리한 후 인간 신생아 포피로부터 얻어 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양시켰다. HEK-N/F 세포는 1:4의 희석 비율로 연속적으로 배양시켰다. 시료를 처리하기 전에 약 3의 PDL(population doubling level)에 이르기까지 성장시키고, 이후 배양하는 동안 각각의 시료를 3 g/ml의 농도로 투여하였다. 배지 교환은 동일한 농도의 시료를 함유하는 배양액을 첨가하여 3일마다 수행하였다. 세포 배양후 본 발명의 박태기나무 추출물, 화학식 5(piceatannol) 및 화학식 9(myricetin)를 처리하여 세포 분열을 관찰하였다.

165> 그 결과, 박태기나무 추출물 및 활성성분은 피부 세포의 수명을 연장시키는 것으로 나타났다. 아무 것도 처리하지 않은 대조군은 평균 수명이 약 35일인데 반하여 박태기나무 추출물을 3 µg/ml씩 처리하여 배양했을 때에는 평균 수명이 42일 정도로 대조군에 비해 약 1.2배 정도 수명이 연장되었다. 활성 성분인 화학식 9(Myricetin)와 화학식 5(piceatannol)을 처리하

여 배양했을 때에는 평균 수명이 각각 56일과 76일로 대조군에 비해 각각 1.6배 및 2.1배 정도 세포의 수명이 연장되었다(도 8). 따라서, 본 발명의 박태기 나무 추출물 및 이로부터 분리한 활성 성분은 세포 수명 연장효과를 가짐을 알 수 있었다.

36) <실시예 9> 텔로미어 길이와 세포수명에 대한 연장 효과

37) 상기 실시예 8에서 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리한 활성성분은 세포수명 연장효과를 가짐을 확인하였다. 이에, 세포수명 연장효과와 텔로미어 길이 사이의 관계를 알아보고자 하였다. 구체적으로, 게노믹 DNA는 핵산 추출 키트(IsoQuick Nucleic Acid Extraction kit, ORCA Research Inc.)를 이용하여 각각의 연령의 세포들로부터 추출하였고, Tris-EDTA(10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 용해하여 4°C에서 보존하였다. 1.5 ml 투브에 10 μl 완충액(TaKaRa) 2 μl, 상기에서 추출한 게노믹 DNA 용액 2 μl를 넣고 3차 증류수를 넣어 전체를 19 μl가 되도록 한 후 제한 효소 *Hinf* I(6 U/1, TaKaRa) 1 μl를 첨가하였다. 상기 혼합액을 37°C에서 3 내지 4시간 동안 반응시킨 후 전기영동을 시켰다. 전기영동시 아가로즈(type I, Sigma) 젤은 브릿지 부분이 1%, 베드부분이 0.8%가 되도록 갤 농도를 조절하여 젤판을 제작하였고(마리솔 KS-8405, 20×4 cm), 1×보이어 완충액(50 mM Tris-HCl, 20 mM 소듐 아세테이트, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl, pH 8.0)를 사용하였다. 마커로는 1 Kb DNA 래더(GIBCO)를 사용하여 0.5 μg을 로딩하였고 모든 샘플은 로딩 버퍼 3 μl씩을 넣고 35 V/cm로 20시간 전기영동을 실시하였다.

전기영동이 완료된 후 에티듐 브로마이드($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 15분간 염색하고 UV에 놓고 확인하였다. 이어서 젤을 0.25 N HCl에 넣어 15분간 전탕한 후 증류수로 2회 세척하였다. 이 젤을 변성액 (0.2 N NaOH, 0.6 M NaCl)에 담그고 실온에서 25분간 전탕한 뒤 증류수로 3회 세척하였다. 6 \times SSC를 채운 블라팅(blotting) 장치에 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuel), 3 mm 노지, 페이퍼 타월, 유리판, 추(2 kg)의 순서대로 얹고 하루 밤 동안 블라팅시켰다. 블라팅이 완료된 후에 막 필터를 3 \times SSC에 담그고 가볍게 수분을 제거한 후 UV에서 웰의 위치를 기입하였다. 노지에 끓여 80°C에서 하루 밤 베이킹(baking)하고 65°C에서 변성된 연어 정자(denatured salmon sperm) DNA(Wako)로 전혼성화(prehybridization) 시킨 후 50°C에서 혼성 완충액(1 Denhan solution, 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 50 g/ml denatured salmon sperm DNA)과 5'-말단 [^{32}P]-표지된 $(\text{TTAGGG})_4$ 로 혼성화시켰다. 혼성화된 막을 세정액(4 \times SSC/0.1% SDS)에 담그고 55°C에서 15분 전탕한 후 건조시켜 랩으로 덮고 X-ray 필름(Scientific Imaging Film, Kodak)과 함께 증감지를 붙인 카세트에 세트하여 -80°C에서 하루 밤 동안 동위원소 현상(autoradiography)을 실시하였다. 현상한 필름과 막의 위치를 합해 매직으로 웰의 위치를 표시하였다. TRFs의 밀도 피크를 레이저 덴시토미터(laser densitometer UltroScan XL, Pharmacia)로 검출하여 그 이동도를 산출하였다.

168> 그 결과, 세포분열을 함에 따라 텔로미어의 길이가 점진적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

도 9에서 보여진 바와 같이, 대조군은 14.8회 분열한 후 텔로미어의 길이가 약 8.0 kbp정도로 감소해 더 이상 분열하지 못했다. 반면, 박태기나무 추출물이나 활성 성분을 처리한 군은 대조군에 비해 훨씬 더 많은 분열을 한 후에 텔로미어의 길이가 임계치(본 발명에서는 약 8.0 kbp)에 도달하였다. 세포분열은 텔로머릭 DNA가 임계치(인간 피부 케라티노사이트는 7.9~8.4 kb인 것으로 추정) 이상으로 유지되는 한 계속될 수 있었다. 이러한 관점에서 텔로미어가 단축되는 속도를 자연시켜 임계치에 도달하는 속도를 늦춤으로써 세포분열 능력이 종료되는 주기를 연장시킬 수 있는 것으로 나타났다. 즉, 대조군의 최대 PDL은 14.1인데 반해 박태기나무 추출물을 투여했을 때에는 최대 PDL이 17.2, 화학식 9(myricetin)은 23.1, 화학식 5(piceatannol)는 29.9로써 최대 PDL이 현저히 증가하였다.

169> 또한, 세포분열 횟수와 상기 측정한 텔로미어 길이의 관계로부터 텔로미어 단축 속도를 계산한 결과, 박태기나무 추출물, 화학식 9(myricetin) 및 화학식 5(piceatannol)를 투여한 군의 텔로미어 단축 속도는 대조군에 비해 각각 1.2, 1.6 및 2.1배 씩 늦춰진 것을 확인하였다(도 10). 따라서, 박태기나무 추출물 및 활성성분의 피부세포 수명 연장 효과는 텔로미어 단축 속도를 늦춤으로써 나타나는 결과로 사료되었다.

170> <제제예 1> 박태기나무 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조

171> 본 발명자들은 상기 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물(제제 1 내지 제제 6)을 하기 표 9 내지 표 11과 같이 제조하였다. 또한, 하기 제조예에 포함된 박태기나무 추출물 이외에도 통상적으로 화장품을 제조하는데 사용할 수 있는 다른 추출물이 추가로 포함될 수 있다. 그 예로, 상백피, 갈조, 당귀, 의이인, 목단피, 마치현, 감잎, 위치하젤 및 센텔라 추출물 등이 있다.

72> 먼저, 본 발명의 박태기나무 추출물을 포함하는 유연화장수 및 점조성액을 하기 표 9에 기재된 조성에 따라 통상의 방법을 제조하였다.

73> 【표 9】

유연화장수 및 점조성액의 제조

원료명(중량%)	제제 1	제제 2
1,3-부틸렌 글리콜	3.7	3.7
글리세린	3.6	5.5
PEG-60 하이드로제네이티드 캐스터 오일	0.3	0.1
D-판테놀	0.3	0.5
알란토인	0.1	0.1
식물 추출물	5.6	5.9
이탄올	4.0	3.0
카보머	0.1	-
산탄 겸	-	0.5
디소듐이디티에이	미량	미량
디포타슘글리시리제이트	-	미량
소듐 히아루로네이트	미량	미량
트리에탄올아민	적량	적량
방부제	적량	적량
조합향료	적량	적량
박태기나무 추출물	2.0	4.0
정제수	to 100	to 100

174> 다음으로, 본 발명의 박태기나무 추출물을 포함하는 유액 및 로션을 하기 표 10에 기재된 조성에 따라 통상의 방법을 제조하였다.

5> 【표 10】

유액 및 로션의 제조

원료명(중량%)	제제 3	제제 4
1,3-부틸렌 글리콜	6.5	4.5
글리세린	1.2	3.0
D-판테놀	0.2	0.1
잔탄검	-	0.5
식물 추출물	6.2	6.3
마그네슘알루미늄실리케이트	-	0.3
에탄올	3.0	-
PEG-60 하이드로제네이티드 캐스터 오일	-	0.2
카보머	0.1	0.1
스테아릭애씨드	1.5	-
폴리소르베이트 60	0.7	0.2
친유형글리세릴스테아레이트	0.6	-
소르비탄세스퀴올리에이트	0.3	-
세테아릴알코올	0.6	-
미네랄오일	5.0	-
스쿠알란	3.5	1.0
카르릴릭/카프릭트리글리세라이드	3.0	0.7
식물성 오일	2.0	2.3
디메치콘	0.4	적량
디포타슘글리지리제이트	미량	미량
알란토인	미량	미량
소듐 히아루로네이트	미량	미량
토코페릴아세테이트	적량	적량
트리에탄올아민	적량	적량
방부제	적량	적량
조합향료	적량	적량
박태기나무 추출물	5.0	6.0
정제수	to 100	to 100

176> 다음으로, 본 발명의 박태기나무 추출물을 포함하는 크림을 하기 표 11에 기재된 조성에 따라 통상의 방법을 제조하였다.

> 【표 11】

크림의 제조

원료명(종량%)	제제 5	제제 6
1,3-부틸렌 글리콜	7.0	5.0
글리세린	1.0	5.0
D-판테놀	0.1	0.1
식물 추출물	3.2	2.7
마그네슘알루미늄실리케이트	0.3	-
PEG-40 스테아레이트	1.2	0.8
스테아릭애씨드	2.0	3.2
폴리소르베이트 60	1.5	0.9
친유형글리세릴스테아레이트	2.0	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5	1.0
세테아릴알코올	3.0	2.9
마이크로크리스탈린왁스	-	1.0
미네랄오일	4.0	2.0
페트롤라툼	-	0.5
스쿠알란	3.8	4.5
카르릴릭/카프릭트리글리세라이드	2.8	2.5
식물성 오일	1.8	2.3
디메치콘	0.4	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량	미량
알란토인	미량	미량
소듐 히아루로네이트	미량	미량
파리독신디팔미테이트	-	미량
산탄 겸	적량	-
카보머	-	적량
토코페릴아세테이트	적량	적량
트리에탄올아민	적량	적량
방부제	적량	적량
조합향료	적량	적량
박태기나무 추출물	5.0	3.0
정제수	to 100	to 100

178> <제제예 2> 항산화 및 노화 억제용 약학적 조성물의 제조

179> 본 발명자들은 상기 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화 및 노화억제용 약학적 조성물을 하기와 같이 제조하였다.

180> <2-1> 시럽제의 제조방법

181> 본 발명의 박태기나무 추출물을 유효성분으로 하여 2%(총량/부피)로 함유하는 시럽은 다음과 같은 방법으로 제조한다.

182> 박태기나무 추출물, 사카린, 당을 온수 80 g에 용해시켰다. 이 용액을 냉각시킨 후, 여기에 글리세린, 사카린, 향미료, 에탄올, 소르브산 및 증류수로 이루어진 용액을 제조하여 혼합하였다. 이 혼합물에 물을 첨가하여 100 ml이 되게 하였다(표 12).

183> 【표 12】

원료명	분량(g)
박태기나무 추출물	2
사카린	0.8
당	25.4
글리세린	8.0
향미료	0.04
에탄올	4.0
소르브산	0.4
증류수	정량

84> <2-2> 정제의 제조방법

85> 유효성분 15 mg이 함유된 정제는 다음과 같은 방법으로 제조한다.

86> 박태기나무 추출물 250 g, 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼합하였다. 상기 혼합물에 10 % 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160 g, 활석 50 g 및 스테아린산 마그네슘 5 g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다(표 13).

187> 【표 13】

원료명	분량(g)
박태기나무 추출물	250
락토오스	175.9
감자전분	180
콜로이드성 규산	32
젤라틴 용액	10%
감자전분	160
활석	50
스테아르산 마그네슘	5

- 188> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 박태기나무 추출물은 항산화 활성이 높으므로, 박태기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 과산화와 관계된 질환의 치료 및 예방에 사용될 수 있다.
- 189> 이하, 본 발명의 박태기나무 추출물을 포함하는 약학적 조성물이 적용될 수 있는 구체적인 질환에 대하여 설명한다.
- 190> 단, 하기의 적용예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 적용예에 한정되는 것은 아니다.
- 191> <적용예 1> 암
- 192> 암의 무수히 많은 원인으로 일어나지만 가장 근본적인 원인으로 활성산소에 의한 세포의 파괴 및 이의 복구 불능으로 세포의 기능의 장애를 일으켜 이것이 진행됨으로써 암으로 전이한다고 밝혀져 있다(Ames, B. N., *Science*, 1983, 221, 1256-1264). 한편, 과일에 든 폐놀산의 간암에 대한 효과(Sun J et al., *J Agric Food Chem*, 2002, 4;50(25), 7449-7454), 토마토에

있는 리코펜(lycopene)의 유방암에 대한 효과(Hadley CW *et al.*, *Exp Biol Med*, 2002, 227(10), 869-80), 이소버바스코시드(isoverbascoside)의 위암에 대한 효과(Chen RC *et al.*, , 2002, 23(11), 997-1001) 등 현재 알려진 여러 가지 항산화제가 다른 암에도 효과가 있다. 따라서, 항산화제는 여러 종류의 암의 치료 및 예방에 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있으며, 항산화 활성이 우수한 본 발명의 항산화용 약학적 조성물은 암의 치료 및 예방에 효과적으로 사용할 수 있다.

193> <적용 예 2> 노화

194> 정상적인 대사과정에서 부수적으로 생성되는 활성산소들은 세포 구성 성분인 지질, 단백질, 당 또는 DNA 등을 비선택, 비가역적으로 파괴함으로써 산화적 손상을 주며, 이것이 오랜 시간 축적되면 노화와 죽음에 이르게 된다(Harman, D, *Free radical theory of aging*, 1986, 3-49). 또한, 실험 조건을 달리해 식이를 제한하거나 운동량을 감소시키는 등 기초 대사율, 즉 산소 소비량을 감소시킴으로서 수명이 연장되는 것이 관찰되었다(Medvedev, Z. A., *Biol Rev.*, 1990, 65, 375-398; Loe, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1971, 32, 103-121; Sohal, R. S., *Aging*, 1982, 5, 21-24). 즉, 활성산소를 제거하는 것이 노화를 자연시킬 수 있는 방법이며 현재 활성산소를 제거하는 항산화제가 많이 개발되어 있다. 따라서, 항산화 활성이 우수한 본 발명의 항산화용 약학적 조성물은 노화를 자연시킬 수 있다.

195> <적용 예 3> 관상 심장 질환, 고지방혈증 및 동맥경화

96> 관상 심장 질환 및 고지방혈증(hypercholesterolemia) 환자에 콜레스테롤 생합성 효소 저해제를 처리하면 저밀도 지방에 있는 콜레스테롤 함량을 감소시키지만, 활성산소에 의한 과산화에 대해서는 유비퀴논 Q10(ubiquinone Q10)의 생합성을 억제하여 저밀도 지단백질을 보호하는 작용을 하여 상기 질환의 치료에 효과적이지 못하여 상기 환자들에게 항산화물질인 세리바스타틴(cerivastatin) 또는 프로부콜(probuco1)을 투여하자 저밀도 지단백질의 함량이 급격히 감소하였다(Lankin VZ et al., *Bull Exp Biol Med*, 2002, 134(1), 39-42). 또한, 항산화제인 디하이드로페리딘 칼슘 길항체 라시디핀(lacidipine)을 동맥경화(atherosclerosis) 환자에게 투여한 임상 실험에서 혈압강하와 함께 혈관벽의 콜레스테롤 수치를 낮추어 동맥경화 병변의 크기가 감소하였다(Haller H et al., *Drugs R D*, 2002, 3(5), 311-23). 즉, 항산화 물질은 관상 심장 질환, 고지방혈증 및 동맥경화와 같이 콜레스테롤과 관련한 혈관계 질환의 치료 및 예방에 있어서 우수한 물질임을 알 수 있으며, 항산화 활성이 우수한 본 발명의 항산화용 약학적 조성물은 관상 심장 질환, 고지방혈증 및 동맥경화와 같은 혈관계 질환의 치료 또는 예방에 사용할 수 있다.

197> <적용예 4> 다발성 경화증 및 자가면역성 뇌척수염

198> 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 자가면역성 뇌척수염(autoimmune encephalomyelitis) 질환 모델 생쥐에 항산화제의 일종인 ALA(alpha lipoic acid)를 투여한 임상 실험에서 상기의 병증도가 약해지는 현상을 관찰하였다. 즉, 산화적 스트레스는 다발성 경화증 및 자가면역성 뇌척수염에 있어서 주된 원인이며 항산화제를 이용하여 상기와 같은 신경 관련 질환을 치료할 수 있다(Marracci GH et al., *J Neuroimmunol*, 2002, 131(1-2), 104-14).

따라서, 항산화 활성이 우수한 본 발명의 항산화용 약학적 조성물은 다발성 경화증 및 자가면 역성 뇌척수염과 같은 신경 관련 질환의 치료 또는 예방에 사용할 수 있다.

99> <적용예 5> 뇌졸증 및 알츠하이머 병

00> 산화적 스트레스, 즉 활성산소는 세포의 구성성분을 산화시켜 이들의 기능 장애를 가져 오며, 이들의 기능 장애로 인해 신경 세포의 기능에도 장애를 준다. 이러한 신경 세포 기능 장애로 인해 발작(stroke), 쇼크(trauma) 등을 일으키게 된다. 그러나 이러한 증상이 치료되지 않고 지속적인 산화적 스트레스가 주어지게 될 경우 심각한 뇌질환 즉, 뇌졸증, 알츠하이머 병과 같은 질환이 생기게 된다. 또한, 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제를 이용하여 뇌졸증, 알츠하이머 병과 같은 뇌질환을 치료할 수 있다(Perry G et al., *Comp Biochem Physiol C Toxicol Phaarmacol*, 2002, 133(4), 507-13; Cecchi C et al., *Free Radic Biol Med*, 2002, 15:33(10), 1372-9; Smith MA et al., *Free Radic Biol Med*, 2002, 1:33(9), 1194-9).

따라서, 항산화 활성이 우수한 본 발명의 항산화용 약학적 조성물은 뇌졸증, 알츠하이머와 같은 뇌질환의 치료 또는 예방에 사용할 수 있다.

201> <적용예 6> 장염

202> 장염 환자의 백혈구에는 과량의 과산화 부산물이 축적되어 있으며, 축적된 과산화 부산물에 의한 세포의 손상은 장의 감염에 있어서 일차적 또는 이차적 병리학 메커니즘의 원인이다. 즉, 산화적 스트레스는 장의 감염을 유도하여 염증성 장염을 일으키는 주된 원인이 다(Kruidenier L

et al., *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(12), 1997–2015). 따라서, 항산화 활성이 우수한 본 발명의 항산화용 약학적 조성물은 염증성 장염 등 염증과 관련된 질환의 치료 또는 예방에 사용할 수 있다.

【발명의 효과】

203> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 박태기나무 추출물 및 이로부터 분리된 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물은 합성 항산화제와는 달리 인체에 무해하고, 다른 천연 항산화제에 비해 항산화 활성이 우수하여 세포내 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 세포노화와 관련 있는 텔로미어 길이의 단축을 억제함으로써 피부세포의 수명을 연장시킬 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 화장료 조성물은 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지, 주름 개선을 위해 유용하게 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

물 또는 알코올 수용액을 추출용매로 사용하여 추출한 항산화용, 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지 또는 주름 억제용 박태기나무 추출물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 알코올 수용액은 메탄올 수용액, 에탄올 수용액, 프로판올 수용액 및 부탄올 수용액으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 추출물.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 알코올 수용액은 50 내지 80% 에탄올 수용액인 것을 특징으로 하는 추출물.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 알코올 수용액은 60% 에탄올 수용액인 것을 특징으로 하는 추출물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 화학식 1(isoliquiritigenin), 화학식 2(2',4'-dihydroxy-4-methoxychalcone), 화학식 3(liquiritigenin), 화학식 4(resveratrol), 화학식 5(piceatannol), 화학식 6(gallic acid), 화학식 7(methyl gallate), 화학식 8(ethyl

gallate), 화학식 9(myricetin), 화학식 10(afzelin), 화학식 11(quercitrin), 화학식 12(myricitrin), 화학식 13(myricetin-3-O-(2"-O-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside), 화학식 14(syringetin-3-O-rutinoside), 화학식 15(syringetin-3-O-2"-O-galloyl)-rutinoside), 화학식 16((+)-catechin), 화학식 17((-)-epicatechin-3-O-gallate), 화학식 18((-)-epigallocatechin-3-O-gallate), 화학식 19((-)-lyoniresinol 3a-O- β -D-xylopyranoside) 및 화학식 20((+)-lyoniresinol 3a-O- β -D-glucopyranoside)로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 추출물.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 추출물은 화학식 6으로 표시되는 화합물을 0.01~1.00 중량%, 화학식 12로 표시되는 화합물을 0.01~1.00 중량%, 화학식 5로 표시되는 화합물을 0.01~0.5 중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 추출물.

【청구항 7】

제 1항의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화용, 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지 또는 주름 억제용 화장료 조성물.

【청구항 8】

제 1항의 추출물로부터 분리한 화학식 1 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 항산화용, 피부 노화 억제, 피부 탄력 유지 또는 주름

의제용 화장료 조성물.

【청구항 9】

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 화장료 조성물은 유연 화장수, 영양 화장수, 영양크림, 엣센스, 팩 및 목욕용 파우더와 같은 피부외용제형 기초 화장품으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

【청구항 10】

제 1항의 박태기나무 추출물을 유효 성분으로 함유하는 항산화 및 노화 억제용 약학적 조성물.

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 주사제, 정제 및 시럽제로 구성된 군으로부터 선택되는 것으로 제조되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 12】

- 1) 박태기나무의 분쇄물을 알코올로 조추출하는 단계;
- 2) 상기 단계 1의 알코올 조추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 부탄을 순으로 추출하는 단계;

3) 상기 단계 2의 에틸아세테이트 분획 또는 부탄을 분획을 수득하여 에탄올:물의 농도 구배로 캘럼 크로마토그래피를 실시하는 단계; 및,

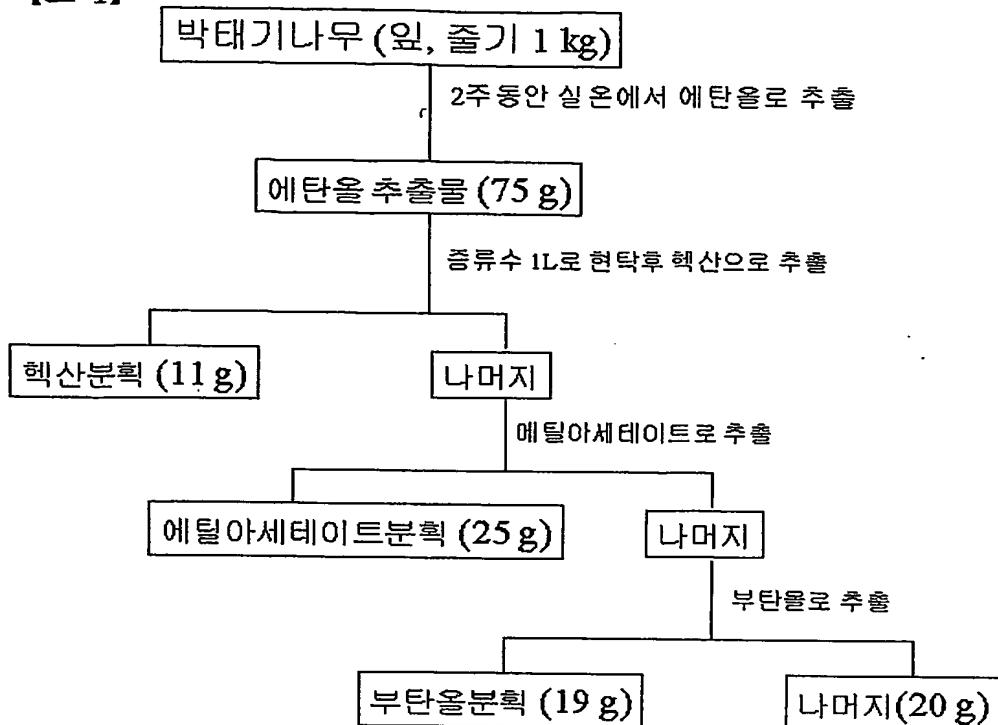
4) 상기 단계 3의 항산화 활성 분획을 수득하여 캘럼 크로마토 그래피, TLC 또는 HPLC를 실시하여 최종 항산화 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제 1항의 박태 기나무 추출물의 제조 방법.

【청구항 13】

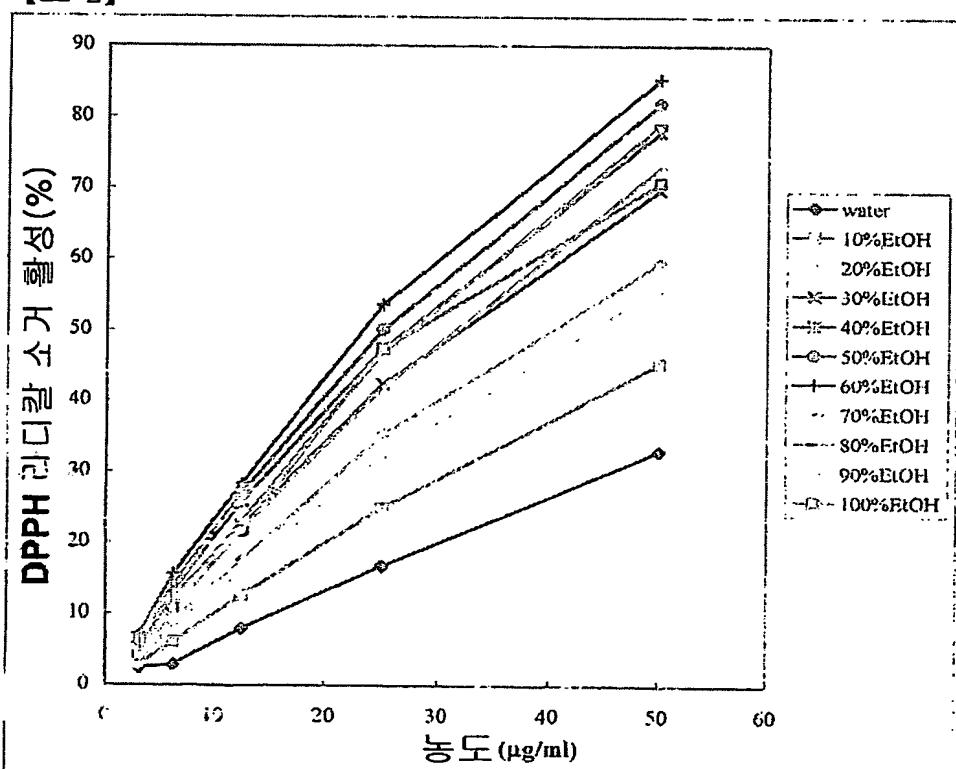
제 12항에 있어서, 알코올은 60% 에탄올인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

【도면】

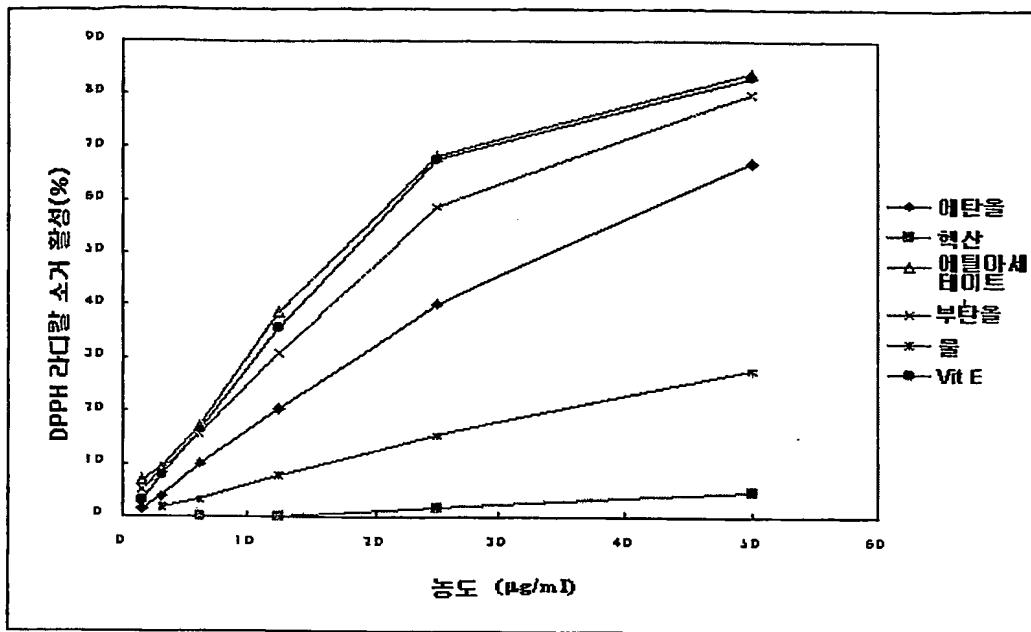
【도 1】



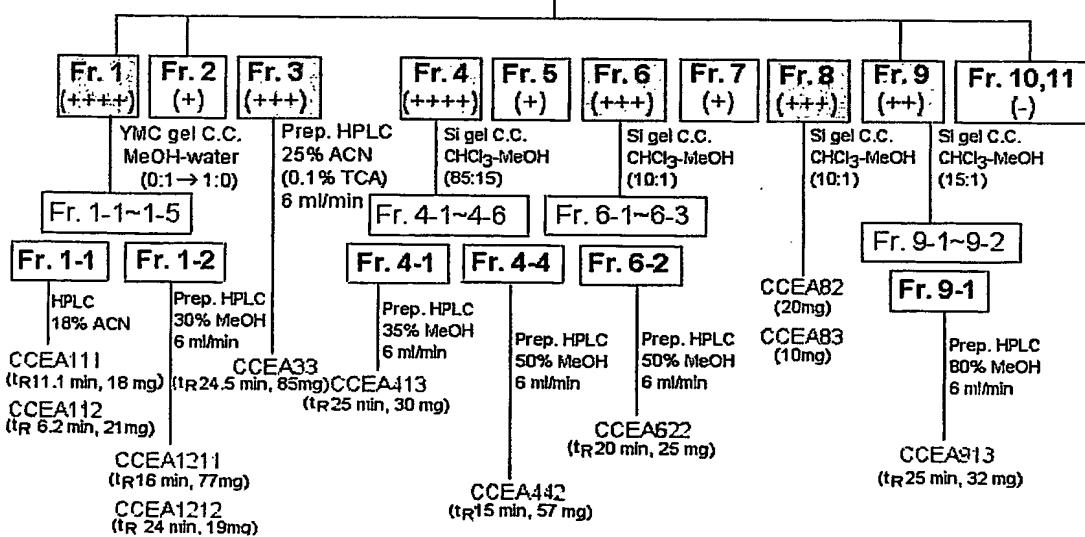
【도 2】



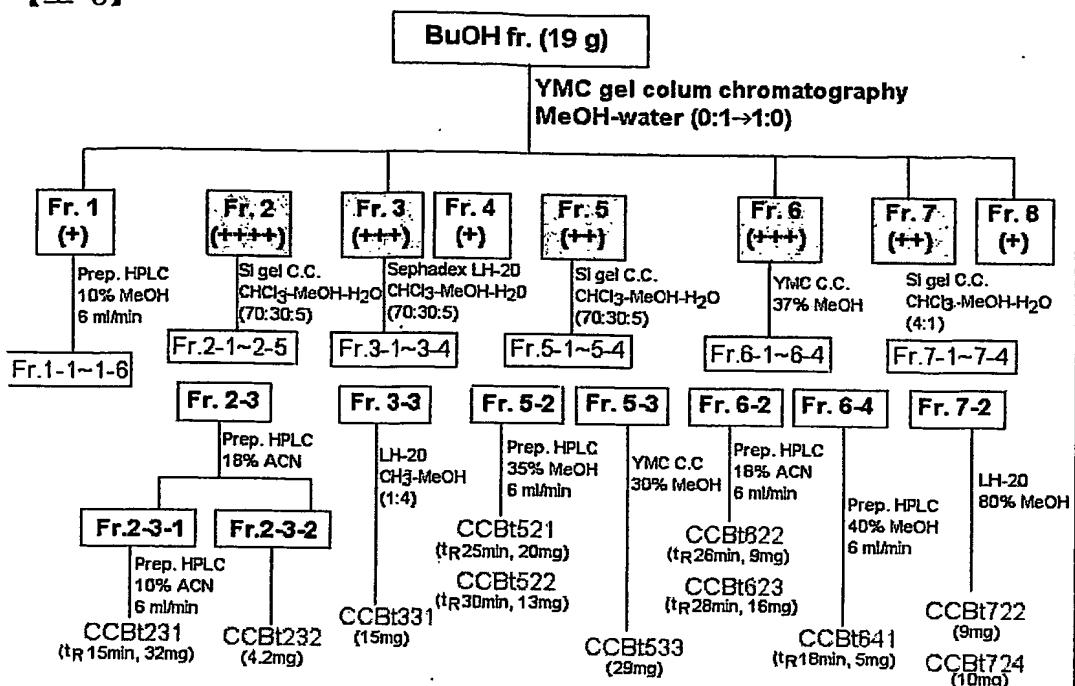
【도 3】



【도 4】

EtOAc fr. (25 g)YMC gel column chromatography
MeOH-water (1:4→1:0)

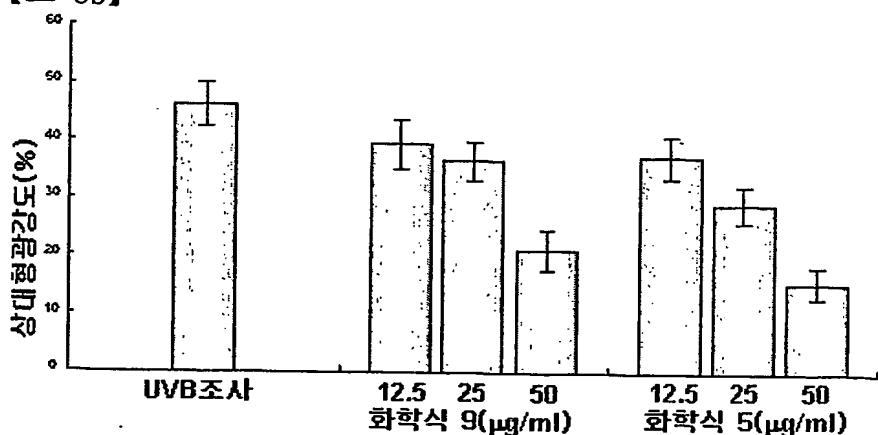
【도 5】



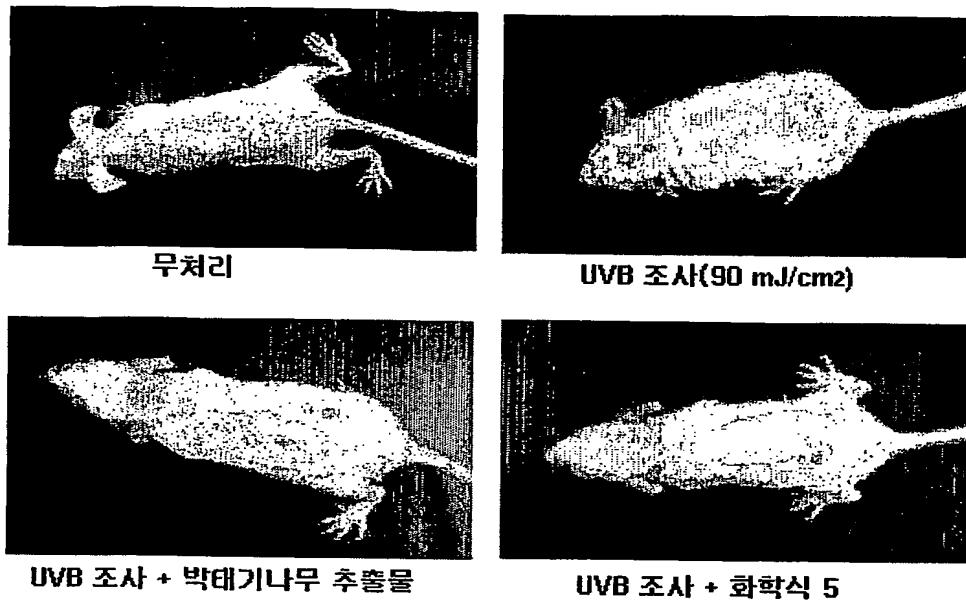
【도 6a】



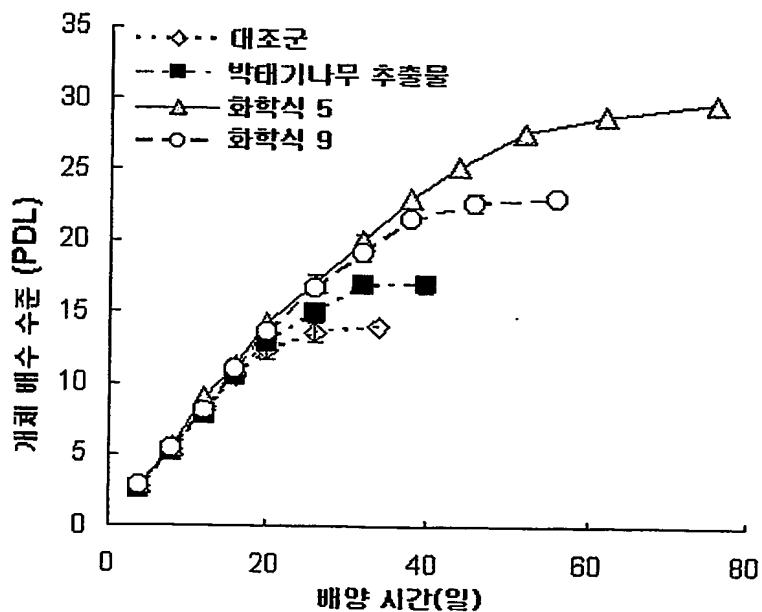
【도 6b】



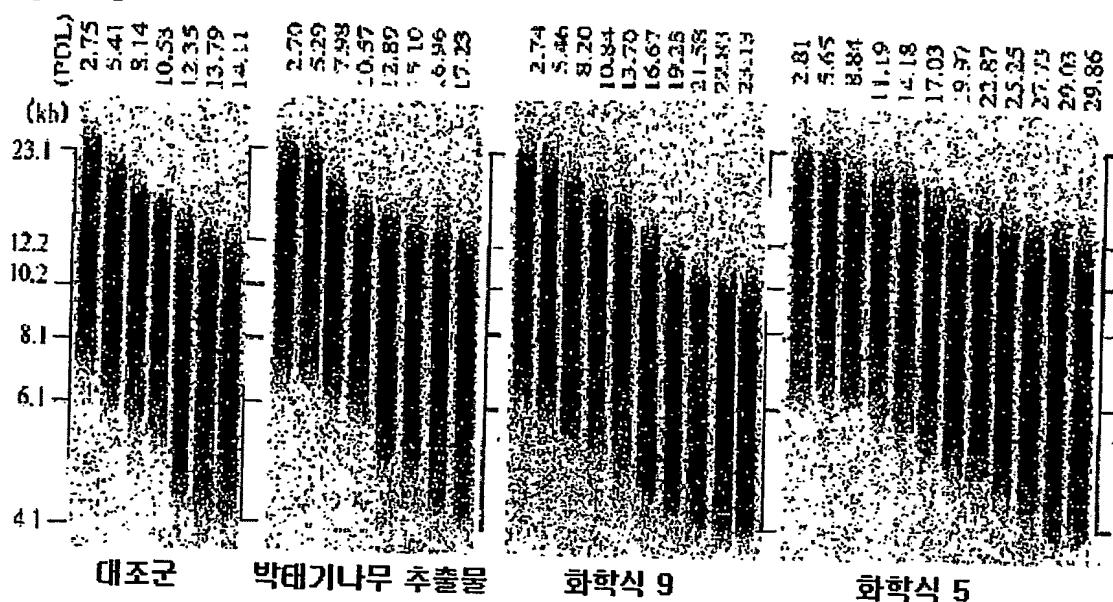
【도 7】



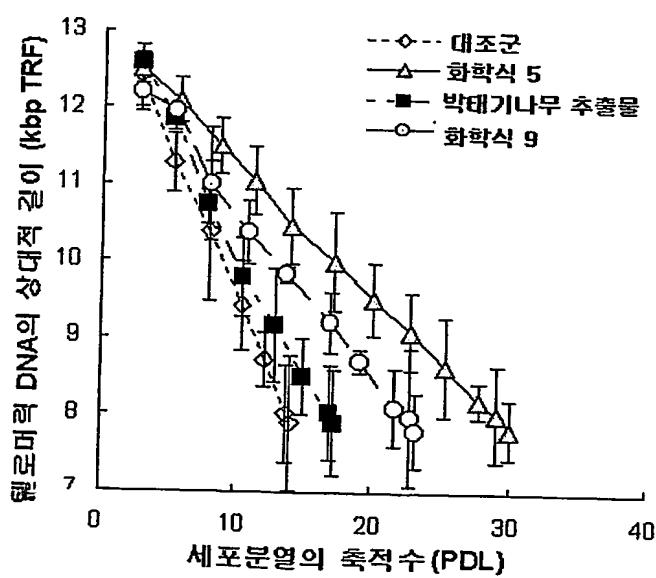
【도 8】



【도 9】



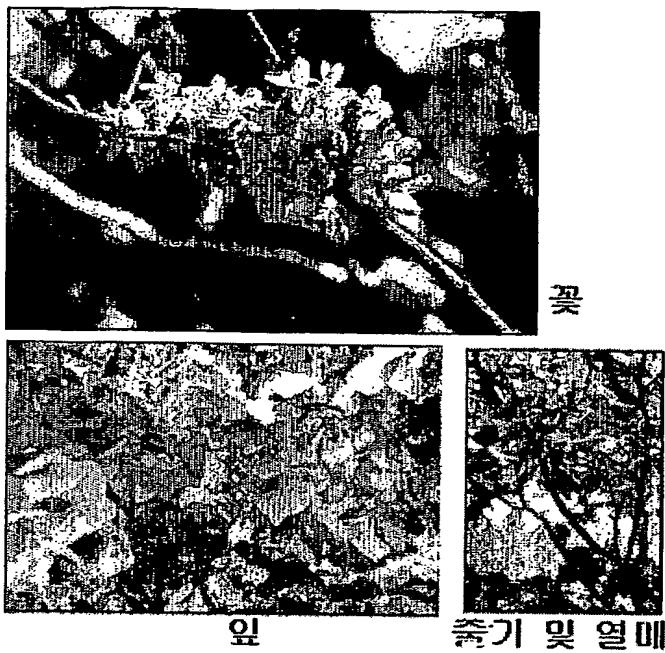
【도 10】



10 85837

출력 일자: 2003/12/11

【도 11】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.